



André Alexandre Lobo **Quantificação de *Club Drugs* em Amostras**
Lopes de Castro **Biológicas em Toxicologia Forense**



André Alexandre Lobo Lopes de Castro **Quantificação de *Club Drugs* em Amostras Biológicas em Toxicologia Forense**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Silvestre, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação da Mestre Sónia Tarelho, Especialista Superior de Medicina Legal do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal.

Dedico este trabalho aos meus avôs, que sempre me incentivaram a nunca desistir de aprender.

o júri

presidente

Prof. Dr. Fernando Manuel de Jesus Domingues
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Aquiles José Ferreira de Araújo Barros
Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Prof. Dr. Armando Jorge Silvestre
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Mestre Sónia Maria Lemos Heleno Tarelho
Especialista Superior de Medicina Legal de 1ª Classe, Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.

agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho trouxe-me mais-valias pessoais e profissionais incontornáveis e marcantes. Sem a colaboração e disponibilidade de diversas pessoas e entidades tal não seria possível.

Um agradecimento muito especial ao Prof. Armando Silvestre pelo seu empenho, exigência, transmissão de conhecimentos e, acima de tudo, sensibilidade humana e apoio demonstrados ao longo de todo o trabalho.

Agradeço também à Mestre Sónia Tarelho, colega de trabalho e amiga, que assumiu, sem medo, o difícil papel de co-orientadora, tendo demonstrado um envolvimento e uma disponibilidade determinantes para a conclusão do trabalho.

Ao Prof. Francisco Amado e a toda a Comissão Coordenadora do Mestrado, agradeço toda a compreensão demonstrada, bem como à Universidade de Aveiro, a quem agradeço também a compreensão e abertura demonstradas para a conclusão do trabalho.

Agradeço também ao Corpo Dirigente do Instituto Nacional de Medicina Legal, especialmente da Delegação do Norte, o interesse demonstrado no desenvolvimento do trabalho e as necessárias autorizações para o mesmo, bem como a disponibilização do equipamento necessário para tal.

Aos meus colegas de trabalho, que me incentivaram desde o primeiro dia, agradeço todo o apoio transmitido.

Aos meus pais, irmã, sogros, familiares e amigos agradeço o seu carinho desinteressado e a paciência com que aceitaram a minha indisponibilidade durante todo este tempo.

Finalmente, à minha esposa agradeço e guardo, acima de tudo, o empenho com que me incentivou a desenvolver este trabalho, a paciência e abnegação com que aceitou a minha indisponibilidade, e o sorriso nos lábios com que sempre me ajudou a ultrapassar todas as dificuldades que foram surgindo.

palavras-chave

club drugs; drogas recreativas; GC-MS; SPE; toxicologia forense.

resumo

As ciências forenses, incluindo a toxicologia forense, apresentam, na actualidade, uma importância acrescida e uma exposição mediática nunca antes atingidas. Os seus resultados são cada vez mais valorizados pelas autoridades judiciais e a sua abrangência é cada vez mais vasta.

Tendo como objectivo a aplicação de conhecimentos e métodos científicos na resolução de questões judiciais, a credibilidade e validação das metodologias utilizadas é fulcral para a aceitação de um resultado que terá sempre consequências judiciais.

O consumo de substâncias psicoactivas usadas para intensificar fenómenos individuais e colectivos de socialização, associadas a um tipo de sub-cultura organizado ou não em “Clubes de Dança” (*dance clubs*), denominada *Rave Subculture*, levanta questões prementes de saúde pública e de envolvimento das autoridades judiciais, quer na prevenção do tráfico, quer na minimização e controlo do seu consumo.

As consequências sanitárias e judiciais trazem também as ciências forenses neste plano, justificando a implementação de métodos de detecção e quantificação deste grupo de compostos, quer para avaliação de estado de influenciado, quer para avaliação e determinação de possíveis causas de morte associadas ao seu consumo.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de determinação analítica de GHB, GBL, cetamina, propoxifeno, PCP, metadona, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam e buprenorfina em líquidos biológicos (urina e sangue total) por GC-MS em modo SIM, precedido de extracção por SPE com colunas OASIS® MCX.

Os resultados obtidos permitiram a validação da metodologia desenvolvida, a partir de níveis terapêuticos, para a cetamina, propoxifeno, PCP, metadona, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam e buprenorfina em amostras de urina e sangue total. O método apenas não se mostrou eficaz a concentrações terapêuticas para o flunitrazepam em amostras de urina, com uma taxa de recuperação de 41%. Os restantes compostos apresentaram taxas de recuperação superiores a 68%. Finalmente, o método de extracção não se mostrou eficaz para o GHB e a GBL.

Com este método o Serviço de Toxicologia Forense adoptou um procedimento generalista para a detecção deste grupo de substâncias, resultando numa maior rentabilização de recursos físicos e humanos e consequente redução de custos.

keywords

club drugs; GC-MS; SPE; forensic toxicology.

abstract

Presently, forensic sciences have been under public authorities' scrutiny and critical look, due to the increasing attention of the media and public opinion, always applying its aim, the use of scientific knowledge to help solving forensic cases. However, to use forensic toxicology results to solve legal cases, it is crucial to have all the analytical methodologies appropriately validated.

The use of psychoactive substances in order to improve social relations and increase body energy in *Rave Culture* has raised many legal and health public concerns, both for illicit trade and consumption. Forensic toxicology plays an important role in this area, mainly linked to the detection and quantitation of these substances, both *in vivo* as in *post-mortem* samples.

In this work, we developed a methodology for the extraction and analysis of GHB, GBL, ketamine, propoxyphene, PCP, methadone, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam and buprenorphine from urine and whole blood samples by SPE (using OASIS[®] MCX SPE columns) and GC-MS in SIM mode.

The results obtained allowed to validate the analytical method for ketamine, propoxyphene, PCP, methadone, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam and buprenorphine, both for urine and whole blood samples, starting in therapeutic values (except for Flunitrazepam in urine samples, with an extraction efficiency of 41%); all the others compounds shown extraction efficiencies above 68%. Finally the extractive procedure wasn't efficient both for GHB and GBL.

This method constitutes a systematic procedure for club drugs detection able to be routinely applied with evident advantages in terms of a more rational and economic use of equipments and human resources.

ÍNDICE

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Índice

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Siglas

1 - Preâmbulo	1
2 - Introdução	2
2.1 - Toxicologia e Toxicologia Forense	2
2.1.1 - Conceito de Toxicologia, Intoxicação e Toxicologia Forense	2
2.1.2 - Etiologia das Intoxicações	3
2.1.2.1 - Intoxicação Aguda	3
2.1.2.2 - Intoxicação Sub – aguda	4
2.1.2.3 - Intoxicação Crónica	4
2.1.3 - Toxicocinética de Xenobióticos	4
2.1.3.1 - Absorção de Xenobióticos pelo Organismo	5
2.1.3.2 - Distribuição de Xenobióticos	6
2.1.3.3 - Biotransformação de Xenobióticos	7
2.1.3.4 - Eliminação de Xenobióticos	8
2.2 - Caracterização Genérica do Grupo “Club Drugs”	9
2.2.1 - Critérios de Selecção das Substâncias a Determinar	11
2.3 - Ácido γ - hidroxibutírico (GHB)	13
2.3.1 - Caracterização	13
2.3.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	15
2.3.3 - Sintomatologia	16
2.3.4 - Percursos (GBL e 1,4-butanediol)	18
2.3.5 - Determinação Analítica	19
2.4 - Cetamina	21
2.4.1 - Caracterização	21
2.4.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	22
2.4.3 - Sintomatologia	23
2.4.4 - Determinação Analítica	25
2.5 - Fenciclidina	26
2.5.1 - Caracterização	26
2.5.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	26
2.5.3 - Sintomatologia	27
2.5.4 - Determinação Analítica	28
2.6 - LSD	28
2.6.1 - Caracterização	28
2.6.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	29
2.6.3 - Sintomatologia	30
2.6.4 - Determinação Analítica	31
2.7 - Propoxifeno	32
2.7.1 - Caracterização	32
2.7.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	33

2.7.3 - Sintomatologia	35
2.7.4 - Determinação Analítica	35
2.8 - Flunitrazepam	35
2.8.1 - Caracterização	35
2.8.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	36
2.8.3 - Sintomatologia	37
2.8.4 - Determinação Analítica	38
2.9 - 3,4-Metilenodeoximetanfetamina (MDMA)	38
2.9.1 - Caracterização	38
2.9.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	39
2.9.3 - Sintomatologia	40
2.9.4 - Determinação Analítica	42
2.10 - Metadona	43
2.10.1 - Caracterização	43
2.10.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	44
2.10.3 - Sintomatologia	44
2.10.4 - Determinação Analítica	44
2.11 - Buprenorfina	45
2.11.1 - Caracterização	45
2.11.2 - Mecanismo de Acção e Metabolismo	46
2.11.3 - Sintomatologia	46
2.11.4 - Determinação Analítica	46
3 - Metodologia Analítica	47
3.1 - Extracção em Fase Sólida	48
3.2 - Derivatização Química	52
3.2.1 - Derivatização por Sililação	54
3.3 - Validação de Métodos em Análise Química	55
4 - Material e Métodos	56
4.1 - Material Utilizado	56
4.2 - Preparação de Soluções	57
4.3 - Extracção em Fase Sólida	58
4.4 - Derivatização Química	59
4.5 - Análise Cromatográfica	59
4.6 - Curvas de Calibração	60
4.7 - Ensaio de Recuperação	61
5 - Resultados e Discussão	63
5.1 - Identificação dos Compostos	63
5.1.1 - Modo de Detecção SCAN	63
5.1.2 - Modo de Detecção SIM	69
5.2 - Especificidade / Selectividade	71
5.3 - Curvas de Calibração	73
5.4 - Linearidade e Gama de Trabalho	75
5.5 - Limiares Analíticos	76
5.6 - Avaliação da Qualidade dos Resultados	77
5.7 - Ensaio de Recuperação	78
6 - Conclusões	80
7 - Bibliografia	84
Anexos	

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valor de pKa dos analitos estudados

Tabela 2 – Produtos químicos utilizados na preparação de amostras

Tabela 3 – Concentração das soluções-stock e soluções de trabalho dos analitos estudados

Tabela 4 – Condições cromatográficas usadas

Tabela 5 – Grupos de iões definidos para aquisição em modo SIM

Tabela 6 – Analitos e respectivo padrão interno

Tabela 7 – Níveis de concentração utilizados nos ensaios de recuperação

Tabela 8 – Tempos de retenção e iões escolhidos para determinação e quantificação em modo SIM

Tabela 9 – Gamas terapêuticas e tóxicas dos compostos estudados

Tabela 10 – Gamas de concentração e valores de caracterização das curvas de calibração obtidas

Tabela 11 – Valores obtidos nos testes de linearidade

Tabela 12 – Limites de detecção e de quantificação dos analitos estudados

Tabela 13 – Valores obtidos nos testes de repetibilidade

Tabela 14 – Rendimento de extracção dos analitos estudados, em amostras de urina e sangue total

Lista de Figuras

- Figura 1 – Possíveis mecanismos de acção de uma substância tóxica, segundo Gibaldi
- Figura 2 – Esquema do processo de distribuição de uma substância tóxica
- Figura 3 – Estrutura química das substâncias-alvo
- Figura 4 – Estrutura química da GBL, do 1,4 – butanediol e do ácido γ -aminobutírico
- Figura 5 – Via metabólica de síntese e metabolismo do GHB
- Figura 6 – Obtenção do GHB a partir da GBL
- Figura 7 – Conversão do 1,4 – butanediol em GHB
- Figura 8 – Metabolização da PCP
- Figura 9 – Metabolitos da LSD
- Figura 10 – Via metabólica do flunitrazepam
- Figura 11 – Procedimento normal de Extracção em Fase Sólida (SPE). A branco os interferentes da matriz e a vermelho o analito de interesse.
- Figura 12 – Estrutura da resina da coluna MCX da OASIS
- Figura 13 – Procedimento utilizado nos ensaios de recuperação para amostras de sangue total e urina e respectiva fórmula de cálculo (comp. – composto; PI – padrão interno)
- Figura 14 – Cromatograma, em SCAN, de mistura não derivatizada de GHB (1), GBL (3) e GHB-d6 (2)
- Figura 15 – Espectros de massa, em modo SCAN, dos picos correspondentes ao GHB e GBL não derivatizados (a) e ao GHB-d6 não derivatizado (b)
- Figura 16 – (a) Cromatograma da mistura derivatizada de GBL (1), GHB-diTMS e GHB-d6-diTMS (2,3)
- Figura 17 – Espectro de massa, em modo SCAN, do GHB-diTMS
- Figura 18 – Cromatograma, em modo SCAN, do d-propoxifeno (10), com identificação dos picos correspondentes aos seus produtos de degradação (4, 5)
- Figura 19 – Espectros de massa do produto de degradação 1 (a), do produto de degradação 2 (b) e do d-propoxifeno (c)
- Figura 20 – Cromatograma (a) e espectro de massa, em modo SCAN (b), da buprenorfina-TMS (13)

Figura 21 – Cromatograma de GC-MS em modo SIM da mistura contendo todos os compostos determinados em modo SIM: GBL (1), GHB e GHB-d6 derivatizados (2, 3)

Figura 22 – Expansão do Cromatograma da Figura 21: propoxifeno (4, 5, 10); PCP e PCP-d5 (6, 7); cetamina (8); metadona (9); flunitrazepam (11); 7-aminoflunitrazepam (12); buprenorfina-TMS (13)

Figura 23 – Cromatograma referente ao reagente de derivatização (BSTFA + TMCS 99:1)

Figura 24 – Cromatograma, em SIM, de um branco de sangue (a) e de uma amostra de sangue fortificada com uma mistura de analitos: produtos de degradação do propoxifeno (4,5), PCP e PCP-d5 (6, 7), cetamina (8), metadona (9), propoxifeno (10), flunitrazepam (11), 7-aminoflunitrazepam (12) e buprenorfina (13) (b)

Figura 25 – Cromatograma, em modo SIM, de um branco de urina (a) e de uma amostra de urina fortificada com uma mistura dos analitos: produtos de degradação do propoxifeno (4,5), PCP e PCP-d5 (6, 7), cetamina (8), metadona (9), propoxifeno (10), flunitrazepam (11), 7-aminoflunitrazepam (12) e buprenorfina (13) (b)

Lista de Siglas

σ : Desvio-Padrão

2-CB: 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina

BSTFA: *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CV: Coeficiente de Variação

ECD: Detector de Captura Electrónica

FID: Detector de Ionização de Chama

GABA: Ácido γ – aminobutírico

GBL: γ – butirolactona

GC: Cromatografia Gasosa

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

GHB: Ácido γ – hidroxibutírico

GHB-d₆: Ácido γ – hidroxibutírico deuterado

GHB-d₆-diTMS: Ácido γ – hidroxibutírico deuterado trimetilsililado

GHB-diTMS: Ácido γ – hidroxibutírico trimetilsililado

HIV/SIDA: Vírus da Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HPLC/UV: Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada a Espectrofotometria Ultra-violeta / Visível

IQ: Ião de Quantificação

LAE: Etilamida do Ácido Lisérgico

LC-MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

Ld: Limite de Detecção

Lq: Limite de Quantificação

LSD: *N,N* – Dietilamida do Ácido Lisérgico

m/z: razão massa / carga

MDA: Metilenedeoianfetamina

MDEA: *N*-etil-3,4-metilenodioxianfetamina

MDMA: 3,4 – Metilenedoximetanfetamina

MSTFA: *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida

MTBSTFA: *N*-metil-*N*-(*t*-butilmetilsilil)trifluoroacetamida

ND: não definido

NMDA: Receptor *N*-metil-D-Aspartato

NPD: Detector Termoiónico

PCA: Ácido 5-(*N*-(1-fenilciclohexil)-amino) Pentanóico

PCHP: 1-(1-fenil-ciclo-hexil)-4-hidroxipiperidina

PCP: Fenciclidina

PCP-d₅: Fenciclidina deuterada

PI: Padrão interno

PMA: Parametoxianfetamina

PMMA: Parametoximetanfetamina

PPC: 4-fenil-4-piperidinociclohexanol

r^2 : Coeficiente de Correlação

s^2 : Variância

SIM: *Single Ion Monitoring*

SPE: *Solid Phase Extraction* / Extracção em Fase Sólida

SPME: *Solid Phase Microextraction* / Microextracção em Fase Sólida

$T_{1/2}$: tempo de meia-vida

TMCS: Trimetilclorosilano

uma: Unidades de Massa Atómica

1. Preâmbulo

A Toxicologia Forense é um ramo da Toxicologia que sofreu uma grande evolução nas últimas décadas, quer ao nível do conhecimento sobre as substâncias estudadas, quer ao nível da sua abrangência de aplicação. No âmbito dessa abrangência, o surgimento de novas substâncias para consumo ilícito, ou a descontextualização do uso legal de outras, justifica uma atenção constante por parte das autoridades competentes, com o intuito de prevenir ou, pelo menos, minimizar danos pessoais, sociais, económicos e outros.

Enquadrando os objectivos gerais da Toxicologia Forense, o primeiro passo na integração desta realidade envolve o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam identificar, e quantificar quando necessário, as substâncias associadas a estes grupos, métodos esses idealmente abrangentes, precisos, reprodutíveis, rápidos, sensíveis, baratos e de fácil desenvolvimento.

Naturalmente que a realidade será bem diferente. No entanto, o desenvolvimento de metodologias que tirem partido dos equipamentos existentes num qualquer laboratório é uma mais-valia essencial na correcta e racional rentabilização dos mesmos.

Considerando também que a quantidade de amostra(s) existente(s) é finita, torna-se necessária a adopção de metodologias analíticas o mais abrangentes possível, em termos de determinação, confirmação e quantificação de substâncias. Evitam-se, assim, gastos elevados em consumíveis, reagentes, tempo de ocupação de equipamentos e recursos humanos, gastos esses directamente e indirectamente ligados a procedimentos analíticos diversificados e específicos para apenas uma ou duas substâncias. Ganha-se em produtividade, em capacidade e na rapidez de resposta do laboratório.

Assim, enquanto que ao nível da investigação pura, a procura de um método específico para uma determinada substância surge como a alternativa mais lógica, a procura e detecção quotidiana de diversas substâncias, associadas a diferentes grupos, como no caso do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, conduz a uma abordagem alternativa, privilegiando a abrangência, sem descurar a sensibilidade.

Justifica-se, assim, o tipo de procedimento desenvolvido, envolvendo um grupo relativamente alargado de substâncias, com óbvias vantagens na estruturação e integração do mesmo num laboratório com características e objectivos semelhantes ao referido.

2. Introdução

2.1. *Toxicologia e Toxicologia Forense*

2.1.1. **Conceito de Toxicologia, Intoxicação e Toxicologia Forense**

A Toxicologia é, por definição, a ciência que estuda os compostos tóxicos e as intoxicações.¹ Inclui o estudo do agente tóxico, a sua origem e propriedades, o seu mecanismo de acção, as consequências dos seus efeitos, os métodos para a sua determinação analítica, quer qualitativa, quer quantitativa, a prevenção ambiental e laboral, as medidas profilácticas e o seu tratamento.¹

Sendo uma ciência já antiga, a sua História confunde-se com a da evolução do Homem e da Civilização. Não pretendendo ser exaustivo, até porque uma descrição histórica não se insere no âmbito deste trabalho, poderá ser referido que ao longo da sua História, o Homem sempre procurou novas substâncias tóxicas, quer com fins bélicos, quer com fins pacíficos, e foi desenvolvendo esta ciência até atingir o grau de complexidade actual.

Uma intoxicação pode ser definida como o conjunto de efeitos devidos à presença e/ou acção de uma determinada substância sobre o organismo. Um Composto Tóxico será, assim, um agente químico que, introduzido no organismo, altera elementos bioquímicos fundamentais à vida.¹

Sendo uma ciência muito vasta, a toxicologia moderna divide-se em diversas vertentes, dependendo do objectivo e da área de actuação. Não havendo, aqui, qualquer hierarquização em termos de importância ou notabilização, a Toxicologia Forense tornou-se, nas últimas décadas, numa área científica de grande relevância para a Medicina Legal, com a consequente evolução, quer técnica, quer científica, o que se traduz num aumento exponencial de responsabilidades, desafios técnico-científicos e capacidade de resposta.

Assim, actualmente, a Toxicologia Forense aborda e utiliza conhecimentos obtidos em diversas áreas da Toxicologia Moderna, desenvolvendo-se, preponderantemente, ao nível da Toxicologia Analítica, tendo como fim a contribuição para a resolução de questões judiciais². Com uma vasta área de acção, poderá incidir sobre o indivíduo vivo ou o

cadáver, abrangendo também, quando aplicável, o Direito do trabalho e o Direito Ambiental.¹

Sobre o indivíduo vivo, a Toxicologia Forense apresenta diversos objectivos de estudo:¹

- Quando o composto tóxico é considerado um agente lesivo;
- Quando o composto tóxico se revela como agente produtivo de alteração psíquica passageira ou permanente, que altere a responsabilidade criminal (o álcool ou algumas substâncias psicotrópicas);
- A intoxicação como circunstância qualificadora do delito (assassinio por intoxicação);
- A intoxicação como delito (consumo de substâncias ilícitas);

Sobre o cadáver, os objectivos de estudo são, naturalmente, diferentes. A morte por intoxicação é classificada pelo Código Penal Português como morte violenta, o que obriga à realização de uma autópsia médico-legal.

Assim, torna-se necessário recorrer a uma série de técnicas analíticas que permitam despistar a influência, directa ou indirecta, de determinada(s) substância(s) tóxica(s) na causa de morte do indivíduo.

Concomitantemente, torna-se também fulcral o conhecimento dos mecanismos e locais de acção de uma substância tóxica, para uma melhor compreensão do acontecimento e selecção das amostras mais convenientes para os fins analíticos.¹

2.1.2. Etiologia das Intoxicações

A forma como a intoxicação surge é importante, quer para entender os seus mecanismos, quer para identificar e isolar as suas consequências. É geralmente aceite que as intoxicações podem surgir de três formas distintas:¹

2.1.2.1. Intoxicação Aguda

Deve-se a exposições de curta duração, com uma absorção muito rápida da substância tóxica. Poderá surgir com a exposição a uma única dose ou a várias doses num

curto espaço de tempo (inferior a 24 horas). As manifestações clínicas surgem rapidamente e a morte ou a recuperação têm lugar num espaço de tempo relativamente breve.¹

2.1.2.2. Intoxicação Sub – aguda

Após a acção do agente, o tempo de surgimento dos sintomas é ligeiramente aumentado. É devida a exposições frequentes ou regulares, durante um período de vários dias, até à aparição dos sintomas.²

2.1.2.3. Intoxicação Crónica

É toda a intoxicação devida a uma exposição ao composto tóxico que se repete, de forma mais ou menos regular, durante um longo intervalo de tempo, o qual pode atingir meses, anos ou mesmo décadas. Para além das áreas referidas acima, apresenta fortes ligações à toxicologia laboral e ambiental.¹

2.1.3. Toxicocinética de Xenobióticos

A resposta de um organismo à presença de uma determinada substância tóxica está dependente, entre outros factores, da quantidade da mesma que atinge o local selectivo onde exerce a sua acção.³ Nesse sentido, a substância apresentará a seguinte sequência de acções:

- Absorção
- Distribuição
- Transformação
- Eliminação

O esquema representado na Figura 1 é uma proposta de resumo de todo o possível mecanismo de acção de uma substância tóxica.³

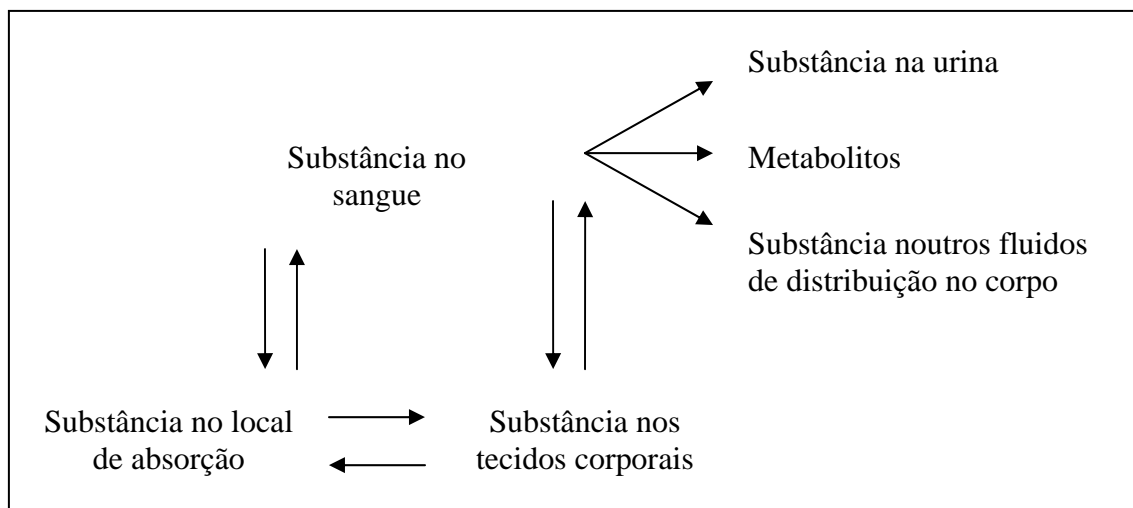


Figura 1 – Possíveis mecanismos de acção de uma substância tóxica, segundo Gibaldi

Uma determinada substância tóxica poderá seguir diversas vias metabólicas, consoante o seu local de acção e metabolismo associado.

Assim, após a absorção, o composto poderá atravessar diversas membranas biológicas e acumular-se directamente no tecido-alvo e/ou seguir através da corrente sanguínea até chegar junto do mesmo. Este processo rege-se por diversos mecanismos de transporte, difusão e equilíbrio, com a ajuda, ou não, de diversas moléculas biológicas facilitadoras da mesma.¹ A distribuição ao longo do corpo até atingir outros tecidos (nomeadamente tecido nervoso, muscular, etc...) está sempre associada a esta tendência para se criar um equilíbrio de concentrações da substância no sangue e nos outros tecidos, assim como a rota que conduz à excreção urinária, onde a passagem da própria substância do sangue para a urina pode estar associada à concentração da mesma nos dois fluidos.

A metabolização das substâncias é um processo irreversível, podendo ser produzidos metabolitos posteriormente eliminados por via urinária, entre outras.¹

2.1.3.1. Absorção de Xenobióticos pelo Organismo

A absorção da substância pode ser feita por diversas vias:¹

- A Via Respiratória é utilizada para a absorção de substâncias gasosas, voláteis, vapores e pós.
- A Via Digestiva é a via mais utilizada nas situações de suicídio, criminais e acidentais. Sendo o tubo digestivo uma membrana biológica, são absorvidas

maioritariamente as substâncias com elevada lipossolubilidade, o que elimina, à partida, a possibilidade de absorção de algumas substâncias tóxicas.¹

- A Via Cutânea permite a absorção de algumas substâncias, podendo dar origem a intoxicações agudas, muito embora não seja uma via de entrada da substância tóxica no organismo usualmente considerada, quer em estudos profiláticos, quer nas possibilidades de tratamento. As substâncias podem atravessar a pele através da epiderme ou através das soluções de continuidade que representam os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e sudoríparas, ou eventuais danos resultantes de agressões corporais, voluntárias ou não.³

2.1.3.2. Distribuição de Xenobióticos

Após atingir a corrente sanguínea, a substância tóxica distribui-se ao longo do organismo atingindo diferentes alvos: o fluído extravascular, os tecidos e os locais de acumulação da substância. Este fenómeno é designado por Distribuição (Figura 2).³

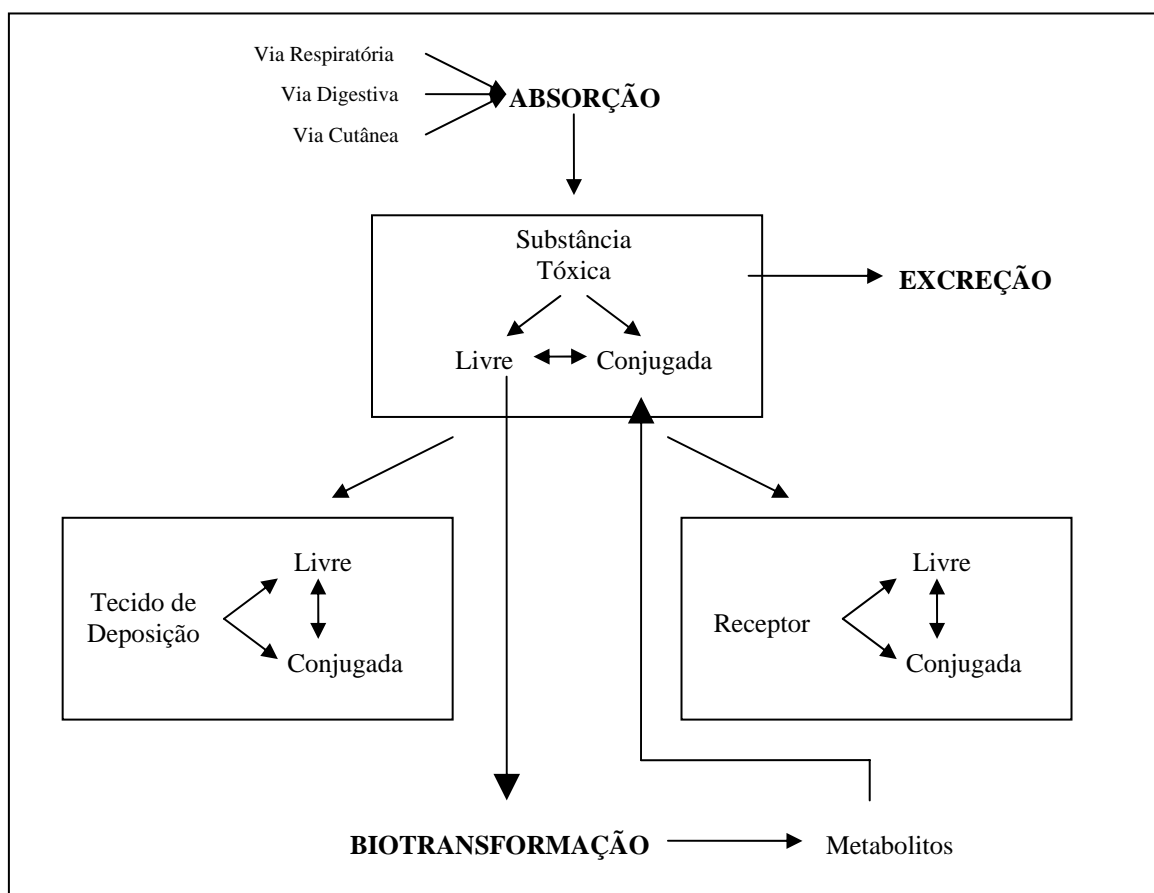


Figura 2 – Esquema do processo de distribuição de uma substância tóxica

O processo de Distribuição é um constante sistema em equilíbrio. Não sendo possível alcançar esse equilíbrio, o organismo trabalha constantemente na sua busca. Os factores associados a este equilíbrio, dinâmico de *per si*, são diversos, desde a concentração da substância e dos seus metabolitos nos diversos locais de acção e/ou de deposição do organismo, até à maior ou menor permeabilidade das membranas biológicas pertencentes aos corpos celulares, células ou tecidos envolvidos na cadeia metabólica da substância.³

2.1.3.3. Biotransformação de Xenobióticos

Durante a sua permanência no organismo, a maioria das substâncias tóxicas sofre processos de metabolização com maior ou menor grau de complexidade. Esses processos envolvem alterações estruturais promovidas por enzimas, com as consequentes mudanças nas características físico-químicas e toxicológicas das substâncias-alvo.² Tal justifica-se pela necessidade que o organismo tem de eliminar estas substâncias. Assim, e devido à presença constante de membranas biológicas, caracterizadas pela sua dupla cadeia fosfolipídica, impermeável a compostos hidrofílicos, torna-se imprescindível a diminuição da hidrofobicidade dos compostos, favorecendo a sua excreção.³

A biotransformação do composto em causa não implica a perda da sua actividade tóxica². Diversos compostos apresentam, inclusivamente, metabolitos com acção tóxica potenciada comparativamente com a substância inicial (imipramina / desmetilimipramina , por exemplo²).

A biodegradação / biotransformação apresenta, em regra, duas fases:³

Fase I: oxidação, redução e hidrólise do composto;

Fase II: conjugação

A Fase I tem normalmente por objectivo a introdução ou exposição de grupos funcionais que aumentem o carácter hidrofílico da molécula (grupos –OH, –NH₂, –SH ou –COOH, por exemplo²).

As reacções da Fase II podem incluir a glucuronização, a sulfatação, a acetilação, a metilação, a conjugação com a glutatona e a conjugação com diversos aminoácidos como a glicina, a taurina e o ácido glutâmico. Os cofactores associados a esta fase reagem com os grupos funcionais introduzidos ou expostos nas substâncias tóxicas após a Fase I,

resultando num aumento elevado da hidrofília do composto-alvo, facilitando a sua posterior eliminação.²

As reacções de biotransformação conduzem a grandes diferenças na acção e potência tóxica da substância introduzida no organismo. Concomitantemente, os mecanismos de biotransformação podem ser comuns (parcial ou totalmente) a outras substâncias tóxicas, com diferentes capacidades de ligação ou diferentes possibilidades de inibição dos mesmos. Todas estas interacções associadas conduzem ao aparecimento de efeitos imprevisíveis, contrários ao esperado ou potenciados, consoante a via metabólica seguida.²

2.1.3.4. Eliminação de Xenobióticos

As rotas de excreção das substâncias tóxicas ou dos seus produtos de biotransformação podem ser as seguintes: a urina, a bile, o ar expirado, o suor, a saliva, o leite materno, as lágrimas, os pêlos e a secreção gastrointestinal.²

O rim é, sem qualquer dúvida, o órgão de eliminação de substâncias tóxicas por excelência. No entanto, muitos dos compostos têm de passar por processos prévios de biotransformação em substâncias hidro-solúveis para poderem ser excretados através da urina. As outras principais vias são a via gastro-intestinal, com a excreção biliar em destaque, e a via pulmonar para substâncias gasosas ou voláteis.²

2.2. Caracterização Genérica do Grupo “Club Drugs”

Embora o álcool continue a ser a “substância socializante” mais comum e socialmente aceite, ultimamente tem sido acompanhado por diversas substâncias psicoactivas usadas para intensificar fenómenos individuais e colectivos de socialização.⁴⁻⁶ Os consumidores utilizam-nas para a obtenção de “novas sensações”, podendo estas ser descritas como uma tendência de procura de novas e estimulantes experiências resumindo-se, na maior parte dos casos, à procura de uma maior desinibição social e de elevada energia para dançar durante longos períodos.⁵⁻⁷ Ao longo dos anos 90, surgiu um grupo de compostos associado a um tipo de sub-cultura organizado ou não em “clubes de dança” (*dance clubs*), denominada *rave subculture*, caracterizada por festas e performances de *disc-jockeys*, *light-jockeys* e *vídeo-jockeys*, com uma duração prolongada, frequentemente organizadas em locais amplos e fechados, como armazéns ou hangares, ou locais isolados ao ar livre.^{4-6,8-11} Estas *club drugs*, também designadas “Drogas Recreativas”, incluem diversas substâncias de grupos diferentes e com variados efeitos,^{7,8,12} sendo as mais comuns a 3,4-Metilenodeoximetanfetamina (MDMA), também conhecida como *Ecstasy*, o γ -hidroxibutirato (GHB), o flunitrazepam (*Rohypnol*®), a cetamina, entre outras.^{4,6-8,12-15}

A abrangência de substâncias é elevada, de estimulantes a depressivos, passando por alucinogéneos.^{7,9} Será conveniente salientar que algumas das substâncias (a cetamina, a fenciclidina, o GHB, o propoxifeno, a metadona) não são propriamente novas, mas apenas são utilizadas de uma forma descontextualizada do objectivo inicial da sua síntese.^{8,16,17} A própria inclusão de algumas das substâncias referidas no grupo das *club drugs* ainda é actualmente discutida, com alguns autores, mais fundamentalistas, a excluírem substâncias que já eram antes utilizadas noutro contexto, enquanto outros incluem todas as substâncias que surjam associadas à “cultura rave”, quer como meio de consumo, quer como próprio símbolo da mesma.¹³ Paralelamente, a abrangência de utilização deste tipo de substâncias aumentou nos últimos tempos, extravasando o contexto *rave* e passando para o meio exterior, com outro tipo de ambientes, começando em idade escolar, sozinhas ou associadas a outras drogas.¹² Dados epidemiológicos recentes sugerem que as *club drugs* estarão a ser cada vez mais utilizadas na generalidade, quer dentro, quer fora do ambiente *club*, sendo detectadas em indivíduos de diversas faixas etárias, diferentes classes sociais, raças e orientação sexual, o que traz preocupações de Saúde Pública,

prevenção e controlo cada vez mais prementes.^{8,11,14,18,19} Dentro da sub-cultura *rave* ou *club* surgiram, inclusivamente, diferentes grupos de elementos, de diferentes idades e com diferentes objectivos, socialmente e individualmente caracterizáveis, que demonstram uma mudança de posicionamento social, deixando o seu espaço “clandestino” ou *underground* e adquirindo uma aceitação socialmente mais fácil ou *mainstream*.^{5,11,20}

As *club drugs* são cada vez mais utilizadas em detrimento de outras drogas de abuso, como a marijuana, anfetaminas ou opiáceos, devido à sua capacidade indutora de interacção social, já que estas substâncias transmitem, na generalidade, sensações de proximidade entre indivíduos, empatia e euforia.⁴ O utilizador dos denominados “alucinogéneos” (dietilamina do ácido lisérgico – LSD, fenciclidina, cetamina), em particular, augura novas sensações e experiências mentais e emocionais, baseadas nos seus efeitos, através de alterações na percepção da realidade por parte do consumidor. Estes efeitos são provocados, de um modo ou de outro, pelas alterações na interacção entre as células neuronais e a serotonina.¹⁷

A popularidade deste tipo de substâncias advém da sua fácil distribuição através de diversos tipos de pastilhas, pós ou soluções líquidas facilmente consumíveis, tendo também associado um preço muito apelativo.^{4,8} Estes compostos também se tornaram muito populares devido ao seu tipo de uso. A não utilização de seringas e outro tipo de acessórios afasta o perigo das drogas “duras” (heroína, cocaína), nomeadamente a ausência das marcas físicas associadas à utilização de substâncias ilícitas injectáveis, e a minimização de contágio de diversas doenças associadas ao consumo dessas mesmas substâncias, o que torna quer o seu utilizador casual quer o seu utilizador regular muito mais “limpos”. Encontra-se também associada uma falsa sensação de segurança, embora a casuística actual contrarie, cada vez mais, esse suposto dado adquirido.^{4,6}

Estas substâncias são regularmente tomadas em conjunto com o álcool ou misturadas com outros compostos, o que torna as suas consequências, muitas vezes, imprevisíveis.^{4,7} O uso combinado de diversas substâncias, quer lícitas, quer ilícitas, é também um padrão de comportamento comum entre indivíduos frequentadores regulares dos locais de animação nocturna (discotecas, bares, *rave parties*, festas de índole privada, etc...). A mistura de diversas substâncias, denominada *polydrug use*, apresenta-se como o comportamento da moda, onde se consomem diversas substâncias ao mesmo tempo, com os efeitos de algumas delas potenciados pela mistura. Álcool, marijuana, estimulantes e

alucinogêneos são os produtos mais consumidos. É este tipo de comportamento que conduz à maior parte dos casos de intervenção médica de urgência.¹⁴

Numa situação de intoxicação, os utilizadores apresentam-se, por vezes, debaixo da influência de uma mistura de substâncias, incluindo drogas estimulantes e depressoras do Sistema Nervoso Central. Tal situação obriga a um controle sintomatológico constante, pois assim que os sintomas predominantes denotam uma situação controlada, os sintomas associados a uma segunda substância podem despoletar-se com uma gravidade mais elevada.^{4,16}

Os riscos associados ao consumo regular ou esporádico das diversas substâncias aqui referenciadas são múltiplos, sendo ainda desconhecidas, ou não se encontrando ainda comprovadas, as consequências a longo prazo de muitas delas.⁹ Muitos dos relatórios publicados são histórias isoladas e investigações “pós-acontecimento”. Com uma variação tão grande de efeitos, consoante os indivíduos, é notada a inexistência incontornável de informação fidedigna, quer relativamente às substâncias tomadas pelos indivíduos, quer relativamente à possibilidade de utilização de eventuais grupos de controle. A própria variabilidade individual nem sempre é possível de ser considerada, antes e após o consumo e o surgimento de sintomas.¹³

2.2.1. Critérios de Selecção das Substâncias a Determinar

A selecção das substâncias a determinar baseou-se em diversos critérios. A MDMA, a LSD, a cetamina, o flunitrazepam, o ácido γ -hidroxibutírico (GHB) e a γ -butirolactona (GBL) fazem parte do grupo estrito das designadas *club drugs*, sendo as substâncias mais consumidas e com a imagem mais facilmente associada aos conceitos *rave* e *clubbing*.

Em contrapartida, surgiram substâncias com consumo associado às atrás referidas, em diversos contextos (metadona e buprenorfina com o flunitrazepam), enquanto que outras se apresentam como os principais metabolitos e/ou produto de degradação *post-mortem* (7-aminoflunitrazepam),²¹ ou com o objectivo de mimetizar alguns dos efeitos pretendidos (d-propoxifeno). As respectivas estruturas químicas encontram-se representadas na Figura 3:²²

Os dados referentes a apreensões de substâncias ilícitas, por parte das autoridades judiciais, em meios associados a esta sub-cultura permitem também avaliar a escolha efectuada.

Por fim, e não menos importante, a sistematização de procedimentos a nível laboratorial, como já atrás foi referido, procura trazer mais eficácia e maior rentabilidade, quer de resultados, quer de custos, racionalizando procedimentos e melhorando a capacidade de resposta do laboratório.

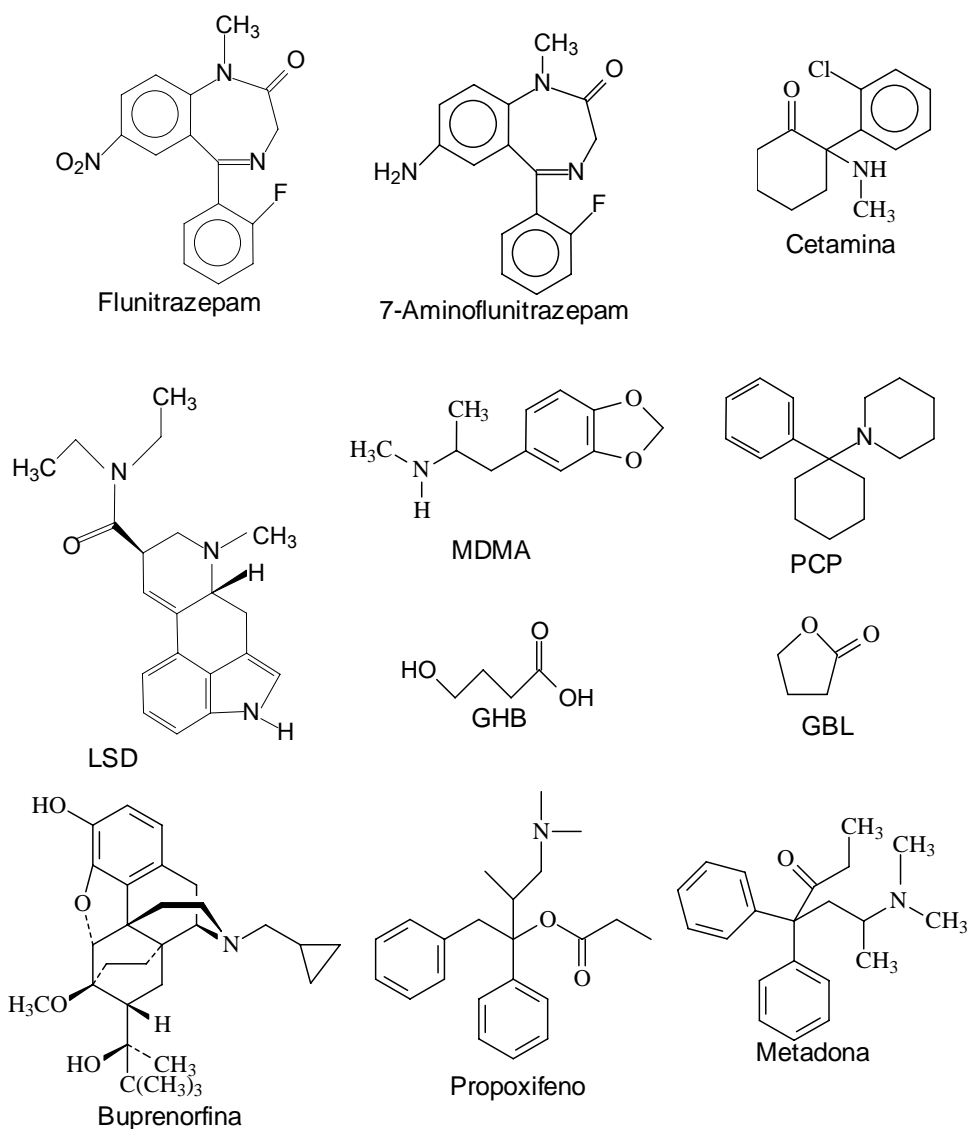


Figura 3 – Estrutura química das substâncias-alvo

2.3. Ácido γ - hidroxibutírico (GHB)

2.3.1. Caracterização

O ácido γ -hidroxibutírico (GHB) é um componente endógeno dos tecidos de mamíferos, nomeadamente no tecido cerebral, sendo caracterizado como um hidroxiácido carboxílico de cadeia curta.^{6,13,14,19,23-33} O GHB foi inicialmente desenvolvido em 1960 como anestésico, tendo uma história de utilização médica de mais de 30 anos, quer na Europa, quer nos EUA, onde era vendido até como suplemento dietético para culturistas, encontrando-se actualmente ainda na cadeia de consumo de substâncias ilegais desse meio desportivo.^{5,6,8,13,19,24,26,28,30,33-38} A partir dos anos 90, este composto passou a estar debaixo da mira das autoridades devido ao seu consumo ilícito.^{23,26,33} Nas primeiras pesquisas associadas à sua descoberta, a sua acção como depressor do Sistema Nervoso Central aparentava semelhanças com os designados “sedativos/hipnóticos” clássicos, nomeadamente benzodiazepinas e barbitúricos. No entanto, actualmente, alguns autores pretendem colocá-lo numa classe farmacológica separada, funcionando como neurotransmissor e neuromodulador diferenciado.^{5,14,23,28,29,33,39-41} Este composto apresenta algumas possibilidades terapêuticas para a narcolepsia, cataplexia, fibromialgia e terapêutica de recuperação de alcoolismo crónico, com uma designação alternativa denominada “oxibato sódico” de GHB, correspondente à sua forma de sal de sódio, para distinção no seu uso clínico.^{4-6,13,19,24,28-30,32-34,38,41-43} Mais recentemente, tem sido estudada a sua utilização na terapêutica de desintoxicação de Opiáceos.^{5,6,13,28} Os seus fins lícitos e de utilização terapêutica incluem o uso, em alguns países, em procedimentos anestésicos e de reanimação, e trabalhos recentes estudam a sua possível actividade contrária à angiogénese induzida por células tumorais.^{5,31,40,41}

Devido aos seus efeitos “relaxantes”, o GHB é utilizado como indutor do sono após o consumo de estimulantes e participação numa *rave party*.^{16,24,28,32} O seu uso tornou-se popular devido à falsa ilusão de segurança. Aumentando o conhecimento sobre os seus efeitos e sobre a sua toxicidade, tornou-se comum como *club drug*, sozinho ou associado ao álcool. Esta associação torna-se especialmente perigosa pelo efeito sinérgico do etanol e do GHB, já que apresentam um perfil farmacológico semelhante.^{6,13,23,28,29,33,37,40,41}

A sua utilização, associado a outras drogas, também é relativamente comum, tendo como objectivo prolongar no tempo o efeito dessas mesmas substâncias, nomeadamente a MDMA, cocaína e metanfetaminas. A combinação de GHB com MDMA é das mais populares, procurando e obtendo os efeitos desejados de ambas as substâncias, com minimização ou, pelo menos, atraso no tempo, dos efeitos indesejados, descritos adiante neste trabalho.^{6,14,28,29,40}

Paralelamente, surgiram descrições da utilização do GHB, associada ou não ao álcool, em casos de crimes sexuais.^{5,13,16,23,25,26,28-30,33,34,37,38,42,44} Um caso descrito na literatura apresentou um valor de 15 mg/L na urina de uma alegada vítima de agressão sexual, surgindo como sugestão para um valor de referência, justificando a sua detecção sempre que surja um caso de suspeita.⁴⁵

Alguns autores referem uma preocupação suplementar, já que poderá haver uma interacção entre o GHB e alguns inibidores proteicos, como o ritonavir, utilizados como terapêutica em pacientes com HIV/SIDA.²⁴

A proibição da sua venda não impediu o aumento contínuo da sua disponibilidade “nas ruas”, para além da sua disponibilidade em diversos *sites* de Internet. Os seus nomes de rua passaram a ser variados: *liquid X*, *ecstasy líquida*, *GHB*, *scoop*, *soap*, *cherry meth*, entre outros.^{6,23,30,34,42} A semelhança dos seus efeitos, quando comparados com os efeitos provocados pela MDMA, levou à adopção da designação de *ecstasy líquida*.¹⁴ Além da sua disponibilização no “mercado negro”, a venda dos seus precursores legais γ -butirolactona (GBL), uma lactona ciclizada a partir do GHB, e 1,4-butanediol, um álcool alifático (Figura 4), tornaram-no ainda mais simples de ser obtido.

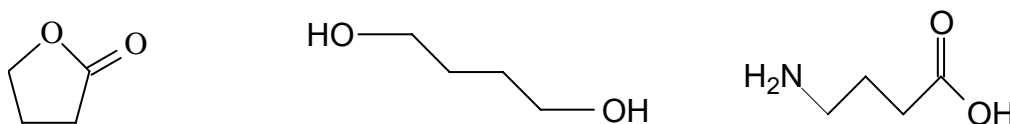


Figura 4 – Estrutura química da GBL, do 1,4 – butanediol e do ácido γ -aminobutírico

Embora também exista como pó, nos ambientes de consumo o GHB é normalmente disponibilizado em solução salgada e transparente, sendo tomado através de colher de chá ou usando como medida a própria tampa do frasco. A sua cor transparente pode ser ultrapassada com a diluição em líquidos corados, a fim de ser distinguido da água.^{24,28,33,34}

A quantidade de composto numa colher de chá é imprevisível e pode variar entre os 500 mg e os 5 g por dose. Tal discrepância pode trazer efeitos imprevisíveis aos consumidores regulares que mudam frequentemente de fornecedor ou de preparação.^{24,28,34}

2.3.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

Sendo uma substância naturalmente produzida no Sistema Nervoso Central, pensa-se que o GHB está envolvido na mediação dos ciclos de sono, temperatura corporal, metabolismo da glicose no cérebro e memória.^{4-6,13,25,28,46} Estruturalmente associado com o ácido γ -aminobutírico (GABA – Figura 4²²), o GHB é simultaneamente um precursor e um metabolito do GABA.^{5,6,13,14,28} É considerado depressor do Sistema Nervoso Central, assim como os seus precursores, embora estes apenas o sejam pela sua rápida passagem a GHB após entrada no organismo.^{6,8,16,28,47} Este composto afecta, também, os sistemas opióides endógenos, nomeadamente da dopamina e da serotonina, actuando através dos mecanismos do Sistema Nervoso Central.^{16,28,29} O seu mecanismo de acção baseia-se na incapacidade de ligação com os receptores GABA_A e capacidade de ligação não competitiva com os receptores GABA_B, desde que se encontre em concentrações superiores às concentrações consideradas normais. Apresenta também receptores muito específicos com alta e baixa densidades, diferentes dos receptores GABA, denominados receptores GHB. Estes receptores apresentam-se em maior número no hipocampo, córtex cerebral e áreas dopaminérgicas.^{13,14,28,41} Apresenta, por isso, um mecanismo de acção duplo.^{14,44} O GHB inibe a libertação de dopamina e activa a tirosina hidroxilase, aumentando, em conjunto, os níveis de dopamina nos terminais nervosos e impedindo a sua libertação, levando aos efeitos de reforço de acção do GHB, nomeadamente com o álcool e a MDMA.^{13,14,28,29}

O GHB administrado externamente atinge rapidamente o tecido cerebral, com uma passagem rápida da barreira “sangue-tecido”. De notar que actualmente é sugerido que os efeitos farmacológicos e clínicos importantes no seu uso recreativo serão mediados pelo receptor GABA_B. O aumento da concentração de serotonina devido à acção do GHB deve-se, muito provavelmente, a um aumento da concentração e biodisponibilidade de triptofano, precursor da serotonina. Tal acumulação, provocada pelo GHB, será devida a uma influência no mecanismo de transporte do triptofano através das membranas celulares neuronais e na barreira “sangue – célula neuronal”.^{14,28,29,40}

Quando tomado oralmente, o GHB rapidamente atinge o cérebro, com os consequentes efeitos ansiolíticos, sedativos e eufóricos. Estes poderão surgir a partir da potenciação dos sistemas dopaminérgicos cerebrais, e através do envolvimento do sistema ligado à serotonina, sendo potenciada uma resposta de re-absorção desta através do aumento do transporte do triptofano.²⁴

O GHB funciona como um neurotransmissor ou neuromodulador, estando a sua fonte primária no organismo, como atrás se disse, associada ao metabolismo do GABA. No entanto, outras duas fontes são associadas à obtenção do GHB: GBL, precursor endógeno e o 1,4-butanediol, álcool alifático de ocorrência natural (Figura 5).^{6,19,23,24,28,34,35,47,48}

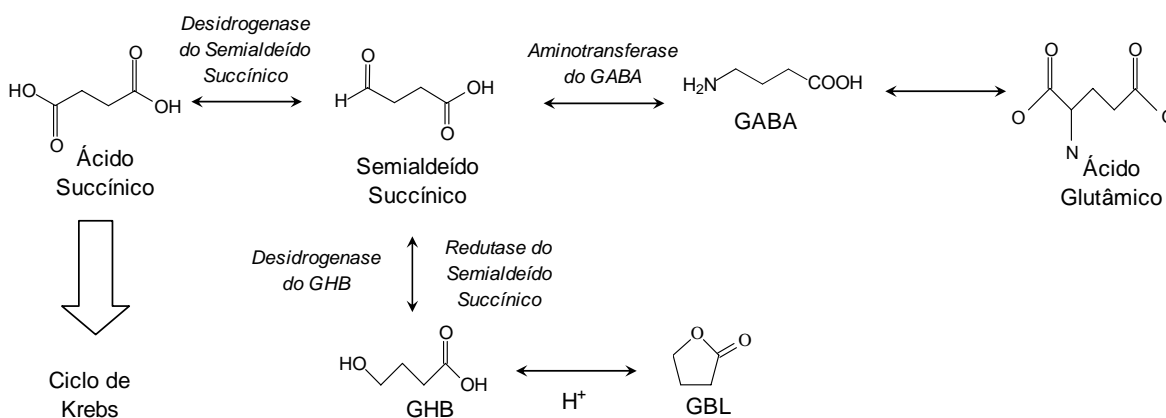


Figura 5 – Via metabólica de síntese e metabolismo do GHB

2.3.3. Sintomatologia

Os efeitos sintomáticos do GHB são semelhantes aos de uma intoxicação alcoólica. No entanto, os episódios de perda de consciência são mais frequentes e imprevisíveis. Os seus utilizadores descrevem sensações de euforia, relaxamento, sociabilidade potenciada, desinibição social e interesse sexual aumentado.^{13,14,16,24,28,37,42} Outros efeitos agudos incluem vômitos, incontinência fecal, confusão mental, tonturas, vertigens, visão turva, suores frios e transpiração excessiva, perda de consciência, tremores, perdas e lapsos de memória, agitação, bradicardia, hipotermia, coma e morte.^{4-6,13,16,24,28,29,49} Todos estes efeitos estão geralmente associados à dose consumida.¹⁶ Assim, as doses mais altas, com ou sem consumo simultâneo de álcool, levam a estados de confusão mental, hipoxia e depressão respiratória, bradicardia e hipotermia, culminando em coma.^{5,8,13,16,28} Os seus

efeitos depressores sobre o Sistema Nervoso Central, associados a uma impossibilidade de controle total da dose consumida, conduzem quer a situações de *overdose* muito rapidamente, podendo levar à morte, quer a uma rápida recuperação do consumidor, com uma passagem quase instantânea de um estado de coma profundo a um estado de alerta normalizado.^{28,40}

Os efeitos do GHB surgem 15 a 30 minutos após a ingestão e o pico de absorção dos mesmos surge por volta dos 60 minutos pós-ingestão.^{4,5,26,28} Sendo rapidamente metabolizado em CO₂ e H₂O, a sua principal via de eliminação é o ar expirado sob a forma de CO₂.^{5,6} Apresenta uma duração estimada dos efeitos de uma dose que não ultrapassa as 4 – 6 horas.^{14,28}

O tipo de consumo ilícito mais comum associado a este composto cinge-se à procura da indução do sono pós-actividade social. Consequentemente, um dos efeitos de dependência mais referidos pelos consumidores é a insónia ou estado de alerta como ressaca. Assim, a rápida metabolização e eliminação do GHB leva ao surgimento de insónias ao fim de duas ou três horas de sono. A situação é contornada com novas e mais altas doses de GHB. Estão descritos valores diários de toma entre 25-100 g de GHB em utilizadores dependentes.^{28,34}

Sendo uma substância que origina dependência física, o desmame do GHB é longo (meses) e traz uma série de diferentes sinais de “ressaca”: ansiedade, tremores, insónia, náuseas e vómitos, diaforese, hipertensão, ataques de pânico, diarreia e taquicardia. Estão descritos casos de *delirium tremens* e estados de esquizofrenia devidos a paragens súbitas de consumo sem qualquer controlo.^{6,13,16,24,28,34,41,44,49}

O GHB passou também a ter uma associação directa a diversos casos de violação. Sendo dissolvido em bebidas, torna-se indetectável (inodoro, incolor e insípido), provocando na vítima perda de coordenação muscular, confusão, sedação, perda de consciência e amnésia.^{8,28,34} A questão associada à amnésia ainda não é consensual, já que alguns estudos efectuados em ratos demonstraram a inexistência desse tipo de acção. É sugerido que a sensação amnésica associada ao GHB seja justificada pela rápida passagem de um estado de consciência a um estado de inconsciência profunda, abrangendo um coma.²⁸ Os níveis de intoxicação atingidos provocam uma incapacidade de resistência das vítimas, à qual se associa a rápida metabolização completa da substância, tornando difícil a detecção da mesma cerca de 12 horas após a ingestão.¹³

2.3.4. Percursos (GBL e 1,4-butanediol)

A γ -butirolactona (GBL), a lactona correspondente do GHB, sendo um seu precursor, é facilmente obtida no mercado em lojas de “produtos dietéticos”, com nomenclatura variada (*Fire Water, Revivariant, Revivariant G, RenewTrient, GH Revitalizer, Verve, GH Release, Gamma-G, InvigorateX-Depress, Furomax e Blue Nitro*). É usada como aditivo na indústria agro-alimentar, com diversas utilizações, e como solvente industrial.^{28,50} A conversão da GBL em GHB é relativamente fácil, sem necessidade de equipamento laboratorial complexo e caro. Esta, assim que é ingerida, é absorvida mais rapidamente do que o GHB, por ser mais lipofílica, e é metabolizada em GHB através de lactonases endógenas (Figura 6).^{6,16,19,28,33,35}

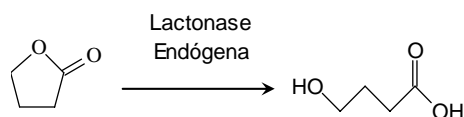


Figura 6 – Obtenção do GHB a partir da GBL

Com características metabólicas e sintomas semelhantes ao GHB, a GBL apresenta uma acção mais dilatada em termos de tempo e uma taxa de absorção mais rápida. O seu uso regular produz também sintomas de dependência e os seus efeitos tóxicos são semelhantes aos do GHB.^{6,16}

O 1,4-butanediol é um álcool alifático que, tal como o GHB, é endógeno no corpo humano¹⁶. Está também disponível em lojas de “produtos dietéticos”, com diversa nomenclatura associada (*(Revital)ize Plus, Serenity, Enliven, GHRE, SomatoPro, NRG3, Weight Belt Cleaner, Thunder Nectar, Pine Needle Extract e Pine Needle Oil*).^{6,19} No entanto, a sua conversão laboratorial em GHB é possível a nível industrial, sendo demasiado complexa e cara para ser realizada em laboratórios clandestinos.²⁸ Assim que é ingerido, é convertido em GHB por duas desidrogenases, nomeadamente a álcool-desidrogenase, que metaboliza o 1,4-butanediol em γ -butiraldeído e a aldeído-desidrogenase, que metaboliza este composto intermédio em GHB (Figura 7).^{6,16,19,28,35}

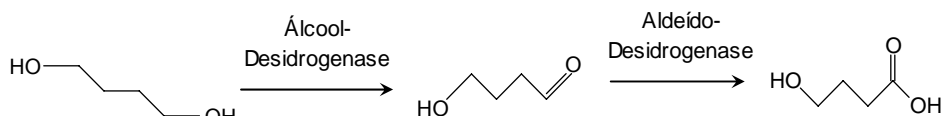


Figura 7 – Conversão do 1,4 – butanediol em GHB

O 1,4-butanediol também é usado como suplemento dietético, apresentando efeitos tóxicos semelhantes ao GHB e GBL. Apresenta dois sintomas característicos: incontinência urinária e fecal.¹⁶

2.3.5. Determinação Analítica

A extensão do uso do GHB e dos seus precursores tem sido discutida, mas a inexistência de testes de rastreio associados a imuno-ensaios ou metodologias semelhantes torna difícil a aplicação de testes de rotina rápidos para a detecção deste composto.¹⁹ Conforme referido acima, o GHB é rapidamente metabolizado em CO₂ e H₂O, não apresentando metabolitos tóxicos na urina 4-12 horas após a ingestão. Este facto torna extremamente difícil a sua detecção em testes analíticos de rastreio de drogas ou numa hipotética entrada num Serviço de Urgência.^{4,6,24,37} Apresentando, em termos de consumo, um tempo de semi-vida de cerca de 30 minutos, a detecção de GHB no sangue ou em plasma também se torna complexa, sendo fundamental uma rápida recolha da amostra.^{19,25,26,37,39}

A produção endógena de GHB é uma dificuldade para a interpretação dos eventuais resultados quantitativos encontrados. A tentativa, por parte de diversos autores, ao longo de vários estudos, de definir valores de referência acima dos quais se pode afirmar que a quantidade de GHB encontrada numa determinada amostra é de origem exógena traduziu-se, até ver, no valor de 5mg/L para amostras de sangue e 10 mg/L para amostras de urina, para indivíduos vivos. Ressalve-se, mesmo assim, que dificilmente se encontrarão valores acima dos referidos 6-12 horas após o seu consumo.^{25,27,28,36-38,46,47}

Também a formação *post-mortem* de GHB é um problema a considerar, já que este continua a ser produzido após a morte do indivíduo. É sugerido que essa produção seja resultado do normal processo de decomposição celular, com a conversão enzimática do ácido succínico, GABA e da putrescina (poliamina presente nas células eucariotas com papel activo na proliferação e diferenciação celular), encontrando-se o GABA como

produto intermédio numa primeira fase e o GHB como produto intermédio numa segunda fase, culminando num consumo total do composto, caso esta cadeia metabólica se esteja a dar por acção bacteriana. As concentrações encontradas em amostras *post-mortem* chegam a atingir valores elevados, o que dificulta em muito a interpretação correcta dos mesmos. Esta produção pode ser minimizada com a recolha da amostra de sangue total para um contentor contendo fluoreto de sódio 1-5% e posterior armazenamento no frio, a 4°C ou, preferencialmente, a -20°C. Nesse sentido, é também proposto um valor de *cut-off* de 30 mg/L e de 10 mg/L para amostras *post-mortem* de sangue e de urina, respectivamente, desde que não sejam notados sinais de putrefacção avançada. Os valores mais baixos encontrados na urina poderão estar associados a uma menor presença de enzimas e de GABA e a uma diminuição na capacidade de sobrevivência das estirpes de microrganismos envolvidas no processo. Dois estudos de armazenamento em congelação a longo prazo (até 50 meses) demonstraram a ausência de alterações significativas na concentração de GHB em diversos tipos de amostras, ao longo do tempo, a partir do momento de armazenamento das mesmas. No entanto, foi demonstrada uma correlação positiva entre o aumento do tempo *post-mortem* (intervalo de tempo entre a morte e a colheita de amostras) e a quantidade de GHB encontrada nas mesmas.^{19,27,39,47,51}

A literatura sugere o isolamento de GHB através de procedimentos de SPE e extracção líquido-líquido associados a derivatização por BSTFA, com detecção e quantificação por GC-MS. O passo de derivatização torna-se crucial devido à instabilidade térmica e natureza polar do composto. Uma alternativa à derivatização seria a conversão do GHB em GBL com posterior injeção em GC. Para ultrapassar este passo, é também sugerida a utilização do LC-MS. Também a electroforese capilar foi utilizada como método de detecção e quantificação de GHB em amostras biológicas.^{25-28,30,33,36,37,40,41,45,47}

Para a GBL, a literatura consultada sugere a utilização do GC-MS com ionização química negativa, no sentido de melhorar a sensibilidade do método proposto. A GBL apresenta, em contrapartida, uma estabilidade comprovada em plasma de pelo menos 3 meses.³¹

A própria estabilidade química *in vivo* do GHB altera-se ao longo do tempo e de acordo com a sua localização no organismo. Assim, tem uma tendência natural em co-existir em equilíbrio com a GBL, muito embora o organismo apresente alguns mecanismos que minimizam essa transformação, como é o caso das lactonases endógenas. No entanto,

se a matriz não possui essa enzima, como é o caso da urina, conteúdo gástrico, ou água, esse equilíbrio poderá ser atingido, estando tal transformação dependente do pH da mesma.²⁸

A conversão de GHB em GBL e vice-versa é um assunto ao qual foi dedicada alguma atenção na literatura consultada. Efectivamente, essa inter-conversão em meio aquoso é observável e poderá ter implicações importantes na procura e utilização da GBL por consumidores de GHB, quer no seu armazenamento, quer no momento do seu consumo. Nesse sentido, justifica-se a detecção da GBL em pós ou líquidos suspeitos de incluírem GHB. Esta interconversão varia com as condições físico-químicas da solução (pH, temperatura, concentração inicial, tempo de exposição aos factores ambientais), podendo, até, surgir outros compostos associados, por reacção da GBL com o etanol, por exemplo.³³

2.4. Cetamina

2.4.1. Caracterização

A cetamina, também designada por 2-(7-clorofenil)-2-(metilamino)-ciclohexanona, é uma arilcicloalquilamina⁵². O hidrocloreto de cetamina foi inicialmente desenvolvido e utilizado como agente anestésico humano. É um derivado do hidrocloreto de fenciclidina e foi introduzido nos anos 60.^{5,6,8,16,17,19,34,53} Veio substituir a fenciclidina, pois esta apresentava um conjunto de reacções pós-anestésicas desagradáveis e perigosas.^{16,52,53} A cetamina ganhou muita popularidade durante a Guerra do Vietname, tendo sido massivamente utilizada.⁵² Esta substância é referenciada como “anestésico dissociativo”, devido aos intensos processos de “sensações dissociativas” descritos pelos pacientes submetidos à sua acção.^{4-6,13,34,52,54-56} Provoca uma incapacidade de resposta do paciente/consumidor quer à dor, quer aos próprios estímulos do meio ambiente que o rodeia.^{52,55} As reacções pós-anestésicas da cetamina envolvem descrições de pesadelos com alto “índice de realidade”, e alucinações várias.^{16,54} Actualmente, o seu uso legal cinge-se maioritariamente à medicina veterinária, como anestésico.^{13,34} No entanto, o interesse sobre a utilização desta substância reacendeu-se, já que apresenta vantagens na

utilização em pacientes pediátricos e em situações específicas de intervenção médica, nomeadamente onde os perigos de depressão respiratória e de diminuição descontrolada da pressão arterial têm de ser evitados.^{6,13,53,56} A sua utilização como broncodilatador em acção de emergência hospitalar em pacientes asmáticos é também considerada.⁵³ A descoberta dos seus eventuais isómeros, o aprofundamento das suas capacidades anestésicas e o seu mecanismo de acção são, também, objecto de intensos estudos na actualidade.⁵

A cetamina é, também, utilizada vulgarmente como *club drug*, obtida normalmente de forma ilegal através do desvio de embalagens de transporte para outros países ou fornecimentos roubados, primariamente destinados a fins veterinários, até porque a sua síntese é relativamente complexa e cara.^{4,5,17,34,52} Este composto entrou nos hábitos de consumo durante os anos 80, provavelmente como adulterante das pastilhas de MDMA, tendo ganho, posteriormente, a sua própria reputação.^{6,55,56} Os seus “nomes de rua” incluem: *K*, *Special K*, *Vitamin K*, *Kit-Kat*, *Keets*, *Super K*, *jet* e *Super Ácido*.^{19,53} Sendo uma substância disponível no estado líquido, a cetamina pode ser administrada por via oral, via nasal, injectada ou fumada, juntamente com marijuana ou outros produtos, encontrando-se também em misturas de substâncias que incluem a metanfetamina, a cocaína, o citrato de sildenafil e/ou a heroína.^{4,6,13,16,34} Esta substância encontra-se disponível em cápsulas, pó, cristais, *tabletes* e em solução líquida injectável, para além das formas legais, também injectáveis.⁵²

Está estruturalmente relacionada com a fenciclidina e com a ciclohexamina, apresentando também comportamento farmacológico semelhante à dizocilpina (MK-801), um medicamento anticonvulsivante semelhante à fenciclidina.^{6,52,57} É produzida a partir de uma síntese complexa, com diversos passos intermédios e sucessivos, usando como precursores o ciclopentil-brometo, o-clorobenzonitrilo e a metilamina. É altamente lipofílica e apresenta uma semi-vida de distribuição de 7-11 minutos.⁵²

2.4.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

A estrutura e mecanismo de acção da cetamina são semelhantes aos da fenciclidina, mas menos intensos, apresentando também um tempo de duração mais curto.^{6,17} O seu metabolito principal é a norcetamina, derivada da sua *N*-desmetilação.^{54,55}

Esta substância causa anestesia sem depressão respiratória devido à inibição da absorção neuronal da norepinefrina, dopamina e serotonina e activação simultânea do glutamato sobre um receptor de aminoácidos de índole excitatória, o receptor do *N*-metil-D-aspartato (NMDA).^{4,5,6,34} O seu local activo é comum à fenciclidina e encontra-se no complexo receptor do NMDA, localizado nos canais de Cálcio, provocando um bloqueio da transmissão de Cálcio através destes canais, no que representa um importante papel nos sistemas neuronais de informação sensorial e comportamental.^{13,34} Este complexo de receptores regula o estado excitatório neuronal através de uma interacção com neurotransmissores como o glutamato e o ácido aspártico.^{34,52} Sendo a cetamina um potente e não competitivo antagonista do NMDA, a sua acção vai bloquear a actividade dos aminoácidos excitatórios referidos (glutamato e ácido aspártico),^{6,13,16,34,52} apresentando, paralelamente, uma interacção com diversos receptores celulares, nomeadamente muscarínicos, nicotínicos, colinérgicos e opióides.⁶ Considerando que a disfunção deste receptor está ligada a situações patológicas de esquizofrenia, torna-se, então, lógico que doses abaixo dos valores “anestésicos” da cetamina tragam sintomas ligados a diagnóstico esquizofrénico.^{34,52} Adicionalmente, a cetamina bloqueia a reabsorção das catecolaminas, gerando efeitos concomitantes com essa acção, nomeadamente o aumento da pressão arterial e da pulsação cardíaca poucos minutos após a injeção, quer intravenosa, quer intramuscular. Há um aumento do fluxo sanguíneo cerebral, do consumo celular de O₂ e da pressão intracraniana. As situações de apneia descritas estão associadas ao consumo de doses elevadas de uma forma muito rápida.^{16,52}

2.4.3. Sintomatologia

A maior parte dos efeitos da cetamina estão ligados directamente à dose administrada.^{34,52} Estes surgem rapidamente e duram de 45 minutos a duas horas, o que conduz a tomas sucessivas da substância para manutenção dos efeitos psicadélicos.^{4,6,16,19,34,52} As doses mais baixas traduzem-se em boa disposição, sensações “dissociativas” (despersonalização, alucinações visuais), sonhos agradáveis e desagradáveis (um conjunto de sintomas denominado *K-land*).^{6,8,13,17,19,52} As capacidades de concentração, atenção e memória também ficam afectadas, com uma diminuição das mesmas.³⁴

Com doses de consumo da substância mais elevadas, surgem os vômitos, náuseas, discurso arrastado, amnésia, capacidades motoras diminuídas, estado de confusão, taquicardia, hipertensão, palpitações, agitação, espasmos musculares, depressão respiratória com apneia e delírio, bem como alterações visuais semelhantes às descritas para outros anestésicos dissociativos.^{4,6,13,16,34,52,53} Passa a ser uma experiência denominada na gíria de *K-hole*.^{13,17,19} Alguns autores referem que os efeitos atingidos com o consumo da cetamina poderão estar associados ao ambiente que rodeia o consumidor, com factores como o ruído e o fumo em locais fechados a conduzirem a uma experiência indesejada de *K-hole*.⁶

Os utilizadores de doses elevadas de cetamina descrevem experiências de “viagem fora do corpo” e de “quase-morte”.^{4,16,17,34,52} São também associadas experiências dissociativas intensas, que poderão incluir *flashbacks*, dias ou semanas após o consumo da substância.^{4,34,52} Estão descritas diversas consequências de índole mental, como ataques de pânico, *stress* pós-traumático, variação constante nas capacidades de percepção, depressão, síndromes maníaco-depressivos, suicídio, insónia, pesadelos diurnos e nocturnos, ilusões paranóides, desrealização pessoal e do mundo, alteração de personalidade, alucinações persistentes e regulares e agressões físicas.^{19,52}

Os efeitos a longo prazo do consumo desta substância ainda não estão bem definidos, embora se pense que possam surgir distúrbios e sequelas neurológicas, psíquicas e/ou cognitivas.^{19,34} Foi notada a destruição de um grupo específico de células neuronais cerebrais no córtex límbico de primatas, embora tal sequela ainda não tenha sido comprovada em humanos.¹⁶ Um estudo considera que o uso regular da substância produz dificuldades na memória semântica e episódica a longo prazo, tendo, no entanto, sido verificada a sua reversibilidade, à excepção dos sintomas “esquizofrenóides”.⁵²

Os consumidores regulares de cetamina demonstram alguns sinais de dependência, com sintomas severos de desintoxicação que requerem cuidados de acompanhamento.⁴ No entanto, na maioria dos casos, não é notada uma “dependência física”, sendo apenas notada uma dependência psíquica. Muito embora, encontram-se descritos alguns casos de sinais de dependência física, associados a síndromas de desintoxicação.^{6,13,16,52}

A mortalidade associada à cetamina é muito baixa. Estão descritos diversos casos onde a cetamina está presente, mas sempre associada ao uso de outras substâncias (álcool, por exemplo). Mantendo-se a análise dos dados no uso “não-médico” da substância, a

principal causa de morte prende-se com o estado de confusão mental que o indivíduo apresenta, levando a actos não controlados, com consequências físicas que poderão ser graves: queimaduras, quedas, afogamento, hipotermia, acidentes de viação ou vítimas de crime. Foram encontrados poucos casos descritos de *overdose* apenas por cetamina.^{52,53}

Inodora, incolor e insípida, a cetamina pode ser misturada em bebidas, o que se traduz na sua utilização com fins de crime sexual, sendo, por isso, também designada como “Droga das Violações”.^{6,17,53}

2.4.4. Determinação Analítica

A detecção de cetamina em urina pode ser “sinalizada” através da obtenção de um resultado positivo no rastreio por imuno-ensaios da fenciclidina, devido às reacções cruzadas características deste tipo de testes, provavelmente associadas à semelhança estrutural das duas substâncias. No entanto, um resultado negativo neste tipo de teste não comprova a negatividade da amostra para esta substância, sendo necessário um método específico de confirmação.^{4,6,19,54} Considerando também que a cetamina pode ser administrada utilizando diferentes vias, será conveniente fazer a quantificação em sangue periférico e sangue cardíaco, já que podem ser encontradas diferenças importantes nas quantidades determinadas em cada amostra, devidas a um processo incompleto de distribuição no organismo.⁵³ Na literatura, encontra-se descrita metodologia de detecção e quantificação por GC-MS após procedimento de extracção por SPE, utilizando as características básicas do composto (amina secundária) para uma extracção mais eficaz, bem como utilizando outros métodos preparativos como a extracção líquido-líquido, derivatização e ionização química.^{53-55,58,59} A detecção do seu pretenso metabolito dehidronorcetamina é ainda alvo de muita discussão, já que é sugerido por diversos autores que este composto é apenas um artefacto do aumento programado de temperatura do GC ou GC-MS, embora tal sugestão tenha sido recentemente refutada.^{54,55}

2.5. Fenciclidina

2.5.1. Caracterização

A fenciclidina (PCP) é uma substância que foi originalmente desenvolvida nos anos 50 para utilização como anestésico. Os seus efeitos secundários, como anestésico dissociativo, conduziram à sua substituição por outras substâncias. No entanto, esses mesmos efeitos secundários, associados a sensações distorcidas de som e imagem e experiências de dissociação, conduziram à sua utilização no âmbito das “drogas recreativas”. Sendo utilizada apenas em intervenções veterinárias, o seu uso em humanos nunca foi autorizado, devido aos efeitos de índole psíquica associados ao recobro pós-anestesia, nomeadamente delírios e extrema agitação.^{17,60} Nos anos 60, a utilização da PCP com fins recreativos tornou-se comum, muito embora os seus consumidores apresentassem queixas devido ao longo período de tempo entre a toma da substância e o surgimento dos seus efeitos. A própria imprevisibilidade dos mesmos também não abonou muito a favor do seu consumo regular.^{17,61} Na forma de pó, a PCP pode ser fumada ou administrada por via nasal, com efeitos sentidos mais rapidamente, sendo estas as formas de consumo mais comuns na actualidade.¹

2.5.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

As substâncias dissociativas actuam através de uma alteração de distribuição do neurotransmissor glutamato nas diversas zonas cerebrais, estando este neurotransmissor envolvido nos mecanismos de percepção da dor, respostas aos estímulos do meio ambiente e memória. A PCP altera também a acção da dopamina, responsável pela euforia e entusiasmo associados ao consumo de muitas drogas de abuso.¹⁷

A PCP sofre uma extensa metabolização por hidroxilação, dando origem ao 4-fenil-4-piperidinociclohexanol (PPC), 1-(1-fenilciclo-hexil)-4-hidroxipiperidina (PCHP) ou através da formação do ácido 5-(N-(1-fenilciclo-hexil)-amino) pentanóico (PCA), sendo este, supõe-se, o principal metabolito na urina (Figura 8).^{60,61}

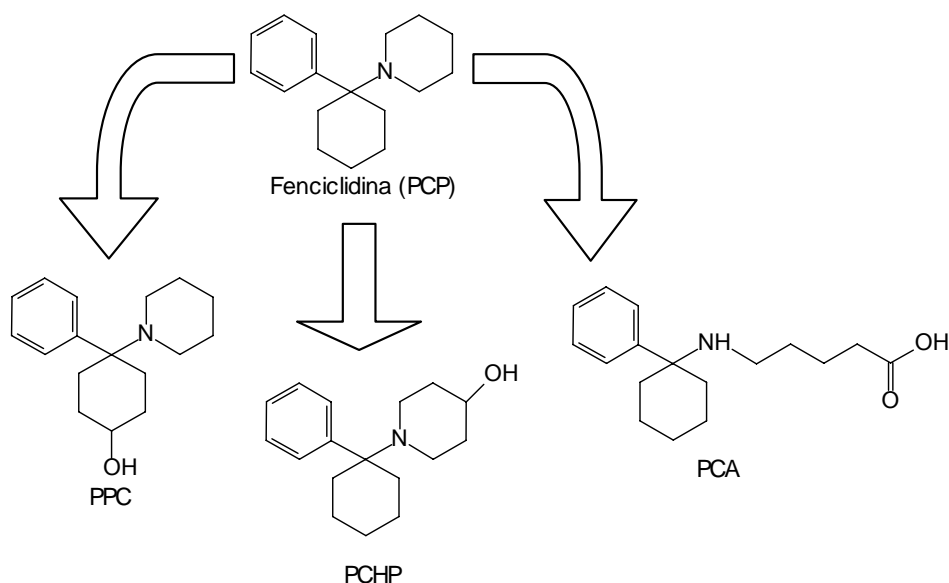


Figura 8 – Metabolização da PCP

2.5.3. Sintomatologia

Os efeitos físicos da PCP variam com a dose administrada. Em concentrações mais baixas, caracterizam-se por respiração rápida e irregular, aumento da pressão arterial e do ritmo cardíaco e temperatura elevada. Aumentando a dose administrada, surgem náuseas, vômitos, vertigens, visão turva, aumento rápido e descontrolado da pressão arterial, do ritmo respiratório e do ritmo cardíaco. Surgem contracções involuntárias fortíssimas dos músculos, com descoordenação total de movimentos e possibilidade de fractura de ossos ou lesões renais devidas à retenção extrema das células musculares, com eventual rompimento das mesmas. Doses muito elevadas da substância levam a situação de coma, convulsões, hipertermia e morte. Ao nível psíquico, surgem efeitos dissociativos, com sensações distorcidas no espaço, tempo e corpo, alucinações, pânico, terror, desorientação, invulnerabilidade, atitudes violentas e/ou suicidas.¹⁷

A utilização regular da PCP poderá conduzir a fenómenos de dependência da substância, física e psíquica, com síndrome de desintoxicação, levando a situações relevantes de depressão e perda de memória, persistentes ao longo de períodos de tempo que podem atingir um ano após o fim do consumo.¹⁷

2.5.4. Determinação Analítica

A PCP apresenta uma estabilidade variável, consoante as condições em que se apresenta armazenada. No entanto, quando mantida a -16°C ou -20°C, não foram encontradas variações na concentração significativas ao longo de 5 anos de ensaios.⁶¹

A determinação da PCP é efectuada maioritariamente por imuno-ensaios, para efeitos de rastreio, e por GC-MS para efeitos de confirmação e quantificação. A utilização de GC-MS em modo SIM é o método mais desenvolvido e descrito, embora sejam também encontrados procedimentos de determinação por HPLC e LC-MS.^{60,61}

2.6. LSD

2.6.1. Caracterização

O termo “alucinogéneo” é geralmente utilizado para descrever um composto que altere a percepção da realidade de um consumidor. A LSD (diminutivo da designação alemã da *N,N* – dietilamida do ácido lisérgico) é a substância mais frequentemente associada ao termo “alucinogéneo”, sendo também a mais popular e mais consumida nesta classe de substâncias.^{17,60,62}

A LSD foi sintetizada pela primeira vez em 1938, na Suíça, por Albert Hofmann, no decurso da sua investigação envolvendo a aplicação de diversos compostos ácidos lisérgicos, derivados da “Cravagem do Centeio” (*Claviceps Purpurea*), um fungo que se desenvolve no centeio. Este foi também o seu primeiro “consumidor”, já que acidentalmente ingeriu uma pequena dose, tendo ficado a conhecer os seus efeitos alucinatórios.¹⁷ A cravagem do centeio é um pequeno fungo parasita, sendo conhecido desde os primórdios da agricultura. Foi, e é, responsável por algumas intoxicações colectivas desde os tempos da Idade Média.^{60,61}

A experiência descrita por Hoffmann, após o consumo involuntário de LSD, envolveu “*uma sequência de imagens fantásticas, de uma extraordinária plasticidade, acompanhadas por um intenso caleidoscópio de cores*”. Esta primeira *trip* de LSD terá durado cerca de três horas.⁶¹

A d-LSD (o único isómero psicoactivo) é um pó branco, inodoro, insípido e solúvel em água, apresentando-se como o mais potente composto conhecido com efeitos ao nível das alterações perceptuais. Pode apresentar-se sob a forma de cristal, pó ou dissolvida em gelatina. Também se apresenta impregnada em quadrados de papel, recortados, sendo consumidos ou aplicados sobre a pele.^{17,60-62}

Como alucinogéneo de elevada potência, as doses activas envolvem quantidades tão ínfimas quanto 20 – 80 µg, sendo encontradas, mesmo assim, doses até 500 µg.^{60,61,63,64}

2.6.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

O mecanismo de acção da LSD ainda não é totalmente conhecido. Alguns autores defendem que a LSD actua sobre um grupo de receptores da serotonina denominados 5-HT₂, influenciando maioritariamente duas áreas cerebrais: córtex cerebral, envolvendo a disposição, cognição e percepção, e o *locus ceruleus*, receptor de sinais sensitivos vindos de todo o corpo, o principal receptor de estímulos externos.

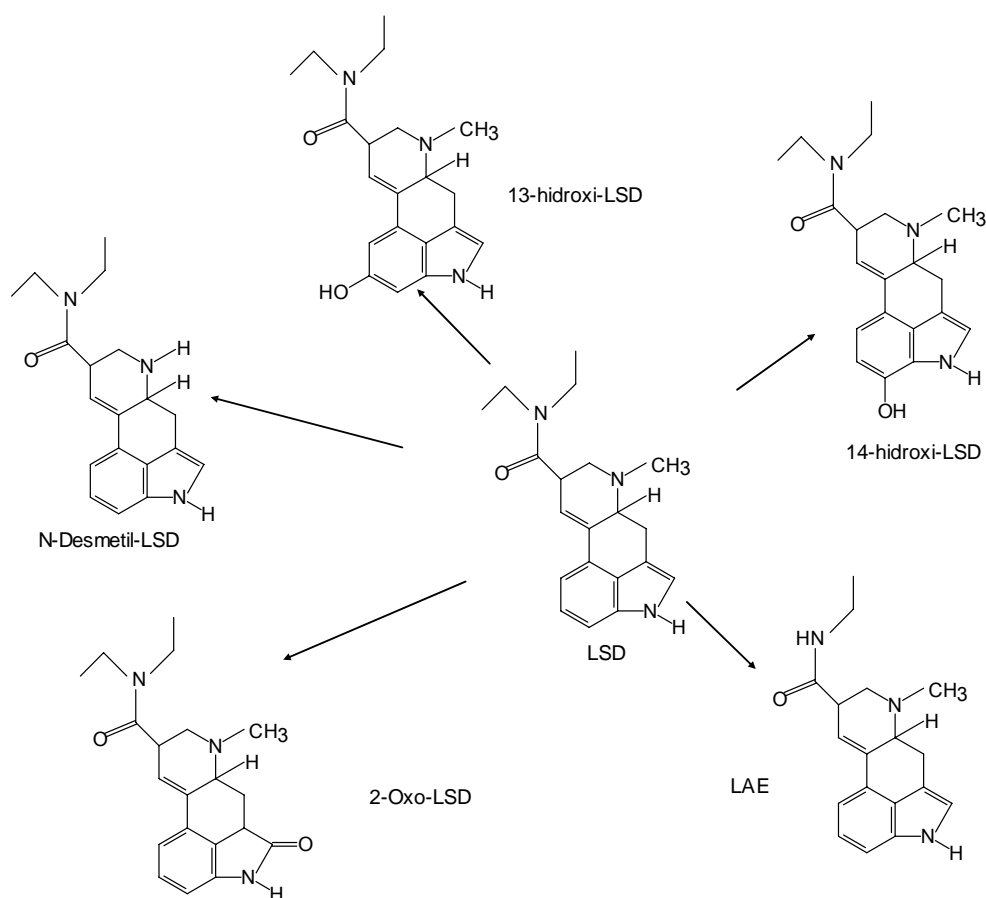


Figura 9 – Metabolitos da LSD

É também defendido que, dependendo da concentração e da presença de outras substâncias, a LSD tanto pode apresentar um comportamento agonista como antagonista da família de receptores serotoninérgicos.^{17,60,61}

Estão identificados diversos metabolitos da LSD, nomeadamente: N-desmetil-LSD (nor-LSD), 13-hidroxi-LSD, 14-hidroxi-LSD, ácido lisérgico etilamida (LAE) e 2-Oxo-LSD (Figura 9).^{60,61}

2.6.3. Sintomatologia

Os efeitos da LSD surgem 30 a 90 minutos após a ingestão, podem durar de 5 a 14 horas e são designados, na gíria, como *trips*, ou viagens. São imprevisíveis, alguns agradáveis e outros desagradáveis, variando com a quantidade consumida, com a personalidade do consumidor e o ambiente que o rodeia.^{17,61}

Os efeitos fisiológicos provocados pelo consumo de LSD caracterizam-se por pressão arterial e ritmo cardíaco aumentados, vertigens, perda de apetite, boca seca, suor elevado, náuseas e vômitos, prostração e tremores. No entanto, os efeitos mais procurados pelos consumidores são os que envolvem áreas emocionais e sensitivas. Os estados de espírito alteram-se a uma velocidade vertiginosa e os sentidos sofrem estímulos de intensidade dramática. Dá-se uma potenciação das sensações de cheiro, tacto, visão, cor, som, entre outras. Atingem-se estados alucinatórios extremamente profundos, com transformação virtual das realidades e dos ambientes que rodeiam o consumidor.¹⁷

O tempo de meia-vida da LSD é de cerca de 5,1 horas, sendo extensamente metabolizada no fígado, com eliminação pela urina de menos de 3% da substância inalterada.^{60-62,64} Não sendo conhecida uma dose letal em humanos, a maior preocupação com o consumo de LSD prende-se com a alteração comportamental, associada ao seu longo tempo de acção, conduzindo a acidentes ou atitudes suicidas de consequências imprevisíveis.⁶⁴

Esta substância promove uma síndrome de habituação rápida, com necessidade de aumento regular de dose consumida para obtenção dos efeitos desejados.^{17,61} Embora não seja considerado um provocador de dependência física, esta síndrome de habituação rápida traduz-se num aumento regular da quantidade consumida. Esse aumento potencia a perigosidade da substância devido aos efeitos imprevisíveis da mesma.⁶¹ Não estando

provada qualquer síndrome de desintoxicação ao longo de um período de tempo pós-finalização de consumo regular, existem, no entanto, dois efeitos de longo prazo descritos, embora ainda não compreendidos na sua totalidade, designados por “Psicoses” e por “Desordem Percepcional Persistente por Alucinogéneos”. São efeitos de índole psíquica, com alterações e sinais diversos de alucinação, mais ou menos recorrentes e regulares, que surgem mesmo alguns anos após o término do consumo da substância.¹⁷

2.6.4. Determinação Analítica

A detecção de LSD é um enorme desafio, pois o composto apresenta diversas limitações.⁶⁵ A LSD é caracterizada por diversos factores que dificultam a obtenção de qualquer resultado de relevo, quer na identificação da substância, quer na criação de uma curva de calibração. Tal deve-se às doses de consumo extremamente baixas, metabolismo extenso, baixa volatilidade da substância, instabilidade térmica e perdas por adsorção irreversível à coluna cromatográfica, contribuindo assim para as dificuldades no desenvolvimento de métodos de confirmação.^{61-63,65,66}

Os níveis de concentração de LSD no plasma e urina encontram-se, frequentemente, na gama dos ng/mL e pg/mL, sendo esta a principal dificuldade na determinação, confirmação e quantificação do analito.^{19,60,61,63,65} A existência de imuno-ensaios específicos para LSD, embora com resultados animadores, não permite a obtenção de resultados quantitativos específicos e precisos, obrigando à utilização de métodos instrumentais de análise.^{61,65} 200 pg/mL de LSD foi proposto como valor mínimo para considerar uma amostra de urina positiva. No entanto, 12 a 24 horas após o consumo de uma dose de cerca de 50 µg, a concentração de LSD na urina desce facilmente para valores inferiores a este.⁶⁶

A estabilidade do composto em solução e em amostras biológicas tem sido alvo de discussão, com resultados, até agora, inconsistentes e uma certa incerteza quanto à forma como as amostras com LSD deverão ser manuseadas e armazenadas.^{61,65} A fotodegradação da LSD tem sido estudada por diversos autores, havendo referências a diferentes taxas de degradação consoante a composição da luz, o tipo de contentor utilizado e a temperatura de armazenamento.⁶⁵

Como foi atrás referido, a extensiva metabolização da LSD traz dificuldades na sua identificação, até porque a detecção dos diversos metabolitos acaba por tornar mais moroso e complexo todo o processo analítico. No entanto, tal torna-se crucial, pois aumenta a janela de detecção de consumo na urina, podendo ser encontrados, inclusivamente, em quantidades mais elevadas.^{67,68} Para além dos metabolitos referidos acima, foram identificados outros em testes com animais, mas ainda não confirmados em humanos.⁶⁵

Os procedimentos de extracção descritos na literatura para a LSD envolvem extracção líquido-líquido associada a SPE ou, em alternativa, extracção por imunoafinidade. Ambas as metodologias são demasiado específicas para a detecção simultânea de outros compostos, o que impede a sua aplicação neste procedimento. A utilização de procedimentos de SPE menos selectivos pode ser compensada com a aplicação de métodos de detecção altamente sensíveis, como GC-MS-MS, ou LC-MS, acompanhados de diversos tipos de derivatização (MSTFA, BSTFA+TMCS, acetilação), todos com resultados aceitáveis.^{60,62-65,67,68}

A adsorção do analito aos compostos de sílica da coluna é, também, uma dificuldade não desprezável na detecção cromatográfica de LSD. A literatura descreve perdas importantes de sinal cromatográfico em amostras fortificadas e padrões puros a diferentes concentrações, principalmente nas primeiras corridas cromatográficas. Este facto vem confirmar o bloqueio dos locais activos da coluna cromatográfica pelas moléculas sililadas de LSD, tornando os resultados obtidos muito irregulares. Esta dificuldade poderá ser ultrapassada com um condicionamento prévio da coluna e injeção prévia (2-3 vezes) de padrão puro de LSD ou de reagente de derivatização na coluna a ser utilizada.^{60,64}

2.7. Propoxifeno

2.7.1. Caracterização

O propoxifeno é um opiáceo, usado como analgésico, estruturalmente e farmacologicamente semelhante à metadona, tendo tido utilização clínica desde 1957. As suas formas isoméricas *d* e *l* apresentam diferentes funções, sendo o isómero *d* um analgésico e o isómero *l* um antitússico. Utilizado, com sucesso, no tratamento e

desintoxicação de opiáceos, apresenta algumas contra-indicações, nomeadamente cardiotoxicidade, fatal em alguns casos descritos. Mesmo assim, o propoxifeno é, também, um dos opiáceos mais frequentemente prescritos às classes etárias mais idosas nos Estados Unidos da América, tornando-o, desse modo, mais fácil de ser desviado para os círculos de consumo ilícito, sendo usado regularmente por toxicodependentes.⁶⁹⁻⁷³ A sua própria disponibilização em farmácias virtuais, acessíveis facilmente através da Internet, com grandes vantagens ao nível do anonimato, tornou-se uma dificuldade acrescida para o controlo do consumo ilícito desta substância.⁷⁴

O uso terapêutico de opiáceos, incluindo o propoxifeno, inclui anestesia cirúrgica e pós-cirúrgica, Intervenção Médica de Emergência, incluindo enfarte de miocárdio, trauma, queimaduras e dor ortopédica. São também usados na terapia da dor crónica associada a diversas enfermidades, com administração a pacientes tumorais e pacientes terminais.⁶⁹

2.7.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

As características farmacológicas dos opiáceos, na generalidade, resultam de uma acção selectiva em diversos locais de ligação do Sistema Nervoso Central. Os opiáceos produzem um efeito analgésico através do bloqueio de transmissão de estímulos dolorosos nos receptores do Sistema Límbico. A interacção entre a substância e os receptores específicos dos opiáceos no nervo terminal impede a libertação do neurotransmissor, interrompendo a transmissão da sensação de dor.⁶⁹

O perfil farmacológico dos diferentes opióides está intimamente associado à interacção que apresentam com os respectivos receptores, dos quais se destacam três tipos principais: receptores μ , receptores κ , e receptores δ . Os receptores μ , dos quais o propoxifeno é agonista, conduzem a uma depressão do Sistema Nervoso Central, com analgesia supraespinal (receptores μ_1) e espinal (receptores μ_2), depressão respiratória, miose, euforia, motilidade gastrointestinal reduzida, hipotermia, bradicardia, tolerância física e dependência física.⁶⁹

Os opióides são classificados, na generalidade, em três grupos, dependentes do seu modo de acção. Os opióides agonistas são aqueles que apresentam grande afinidade com um dos grupos receptores de opiáceos. Os opióides antagonistas inibem a ligação dos agonistas, diminuindo o efeito analgésico, sendo utilizados na terapêutica para desintoxicação de opiáceos. Os compostos que apresentam um efeito agonista com um dos

tipos de receptores e um efeito antagonista com outro tipo de receptores são designados agonistas/antagonistas.⁶⁹

A evolução da farmacologia e da indústria farmacêutica conduziu à disponibilidade de vários compostos opióides semi-sintéticos ou totalmente sintéticos, classificados como:⁶⁹

- fenantrenos: morfina, codeína, dihidrocodeína, hidrocodona, hidromorfona, oxycodona, oximorfona, buprenorfina, nalbufina.
- fenilheptilaminas: metadona, **propoxifeno**.
- fenilpiperidinas: fentanil, meperidina.
- morfinóides: levorfanol, butorfanol.
- benzomorfenos: pentazocina.
- ciclohexanois: tramadol.

Como já referido acima, o propoxifeno, em particular, é utilizado na terapia de desintoxicação de opiáceos, comum entre consumidores regulares de diversas outras substâncias do grupo, nomeadamente heroína.⁶⁹ A crescente prescrição do propoxifeno tem tido como consequência um aumento no número de casos descritos de intoxicação, o que conduz a uma atenção redobrada sobre a sua utilização a nível clínico e detecção analítica a nível forense, com particular realce sobre o seu consumo, de forma lícita ou ilícita, associado ao consumo de álcool.^{70,71}

Esta substância é rapidamente distribuída e acumula-se no encéfalo, pulmões, fígado e rim. A sua metabolização, através de uma *N*-desmetilação, conduz à formação do metabolito norpropoxifeno, com um tempo de meia-vida e potência tóxica superiores. Uma segunda desmetilação e a sua desidratação conduzem a uma ciclização do composto. Poderá ocorrer também uma conjugação e hidroxilação. Cerca de um terço da substância consumida é excretada através da urina em menos de 24 horas.⁶⁹

2.7.3. Sintomatologia

Os efeitos do propoxifeno são comuns ao grupo dos opiáceos, incluindo a sedação, depressão do Sistema Nervoso Central, tonturas, euforia e alteração da percepção sensorial, nomeadamente da dor, com efeitos dissociativos associados.^{75,76}

2.7.4. Determinação Analítica

Foram encontradas diversas metodologias descritas na bibliografia consultada. Os métodos menos recentes propunham a utilização de GC com um detector FID e extracção líquido-líquido, enquanto os mais recentes apresentam já a utilização de GC-MS, HPLC e rastreio em urina por imuno-ensaios.^{58,70}

O d-propoxifeno apresenta uma degradação térmica, com a formação de dois produtos de degradação, em picos subsidiários do pico cromatográfico principal, estando descrita uma perda máxima de 7% para temperaturas de injeção entre 210°C e 250°C. Acima dos 260°C, a degradação aumenta, com perda do ácido propiónico, sendo então sugerida uma temperatura de injeção de 250°C para minimizar esta dificuldade.⁷⁰ A própria estrutura do composto conduz, em situação de ionização por impacto electrónico, à obtenção de um ião 58 muito dominante e inespecífico, o que dificulta uma correcta quantificação. Para ultrapassar esta questão, a literatura consultada sugere a detecção e quantificação por HPLC-UV e LC-MS.^{71,72,77}

2.8. Flunitrazepam

2.8.1. Caracterização

O flunitrazepam, também designado por *Rohypnol*[®], é uma benzodiazepina de acção muito potente, sedativo-hipnótica, com rápida absorção, pertencente ao grupo das 7-amino benzodiazepinas.^{4,6,8,13,42,78,79} É utilizado na preparação do paciente cirúrgico como pré-anestésico, como sedativo e no tratamento de insónia.^{4,6,19,79} Comparada com o diazepam (a benzodiazepina mais popular), o flunitrazepam apresenta uma potência de

acção cerca de dez vezes maior.^{6,42} Um estudo de 1997 refere-se ao flunitrazepam como uma das substâncias mais comuns nos casos de morte por intoxicação medicamentosa.⁷⁹

Desde os anos 90 que o flunitrazepam é utilizado como “droga recreativa” e como “droga de violação”, aumentando as preocupações das autoridades em torno da sua disponibilidade, venda e consumo.^{4,42,79} Sendo facilmente solúvel em bebidas, esta substância é inodora e insípida, o que a torna indetectável para a vítima.¹³ É utilizada devido aos seus efeitos relaxantes e por “predadores sexuais” para inibição química das suas vítimas.^{16,19,42} Apresenta diversos nomes de rua, nomeadamente: *Roofies*, *la Rocha*, *Roche*, *R2*, *Rope*, *FM2*, *Forget-me Pill*, *Rowie*, *Run-trip-and-fall*, *Los Dos* e *Mexican Valium*.^{19,78}

2.8.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

O flunitrazepam é um agonista muito eficaz do complexo Receptor-GABA-Benzodiazepina, com uma farmacologia semelhante à de outras benzodiazepinas.^{13,16} Medeia a neurotransmissão inibitória no cérebro e na espinal-medula.¹³ O complexo Receptor-GABA-Benzodiazepina trabalha como mediador da actividade do flunitrazepam, nomeadamente na acção relaxante muscular, sedativa, amnésica e anti-convulsivante.^{6,13,16} As benzodiazepinas ligam-se ao receptor GABA, abrindo os canais de cloreto nas células neuronais, dando-se um influxo de cloretos e consequente hiperpolarização celular. Esta sequência traduz-se num decréscimo da excitabilidade celular, com efeitos clínicos conhecidos, nomeadamente sedação, actividade anticonvulsivante e redução de ansiedade.¹³

O metabolismo do flunitrazepam inclui a sua redução a 7-aminoflunitrazepam, com passagem ao metabolito *N*-glucurónico, desmetilação para o *N*-desmetil-7-aminoflunitrazepam, hidrólise para o metabolito 3-OH e finalmente para o metabolito *O*-glucurónico (Figura 10). A sua eliminação dá-se 90% pela urina e 10 % por via fecal (valores aproximados).⁴²

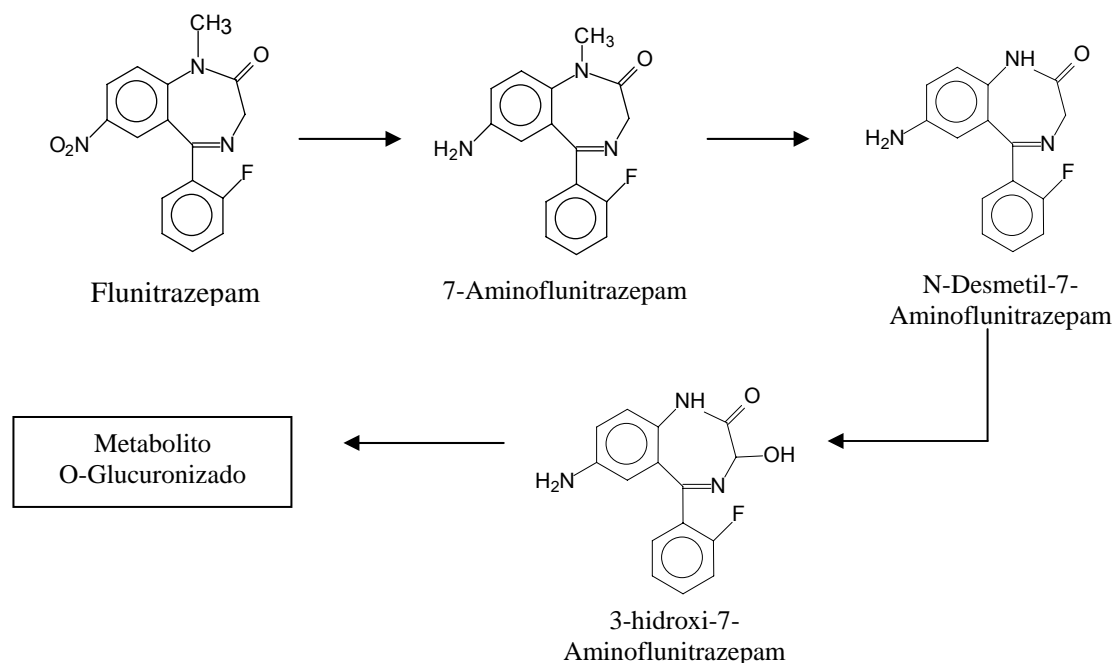


Figura 10 – Via metabólica do flunitrazepam

2.8.3. Sintomatologia

O flunitrazepam é caracterizado por reduzir a ansiedade, provocar inibição da tensão muscular, amnésia, perda de controlo muscular e perda de consciência.^{4,6,8,13,16,19} Os efeitos surgem cerca de 30 minutos após a ingestão, têm o seu pico ao fim de duas horas e podem durar até 8 a 12 horas.^{4,6} Todos estes efeitos são potenciados com a utilização de álcool ou outras substâncias de efeito sedativo, estando dependentes da dose.^{4,6,16} É a benzodiazepina mais escolhida para utilização “ilegal” devido a esta dualidade que engloba uma rápida absorção e duração prolongada de efeitos.¹³ Alguns utilizadores descrevem sensações de desequilíbrio, confusão, distúrbios visuais, retenção urinária e comportamento agressivo.⁴ Alguns casos descritos referem sintomas contrários, nomeadamente hiperactividade.¹⁶ Esta substância pode ser utilizada juntamente com a heroína, potenciando os efeitos desta e diminuindo os efeitos de ressaca e desintoxicação.^{6,13} Permite também potenciar os efeitos de outras substâncias, nomeadamente álcool ou marijuana, “cortando”, simultaneamente, os efeitos adversos, por exemplo, da cocaína.^{6,13,42}

Os efeitos “secundários” do flunitrazepam caracterizam-se por diminuição da temperatura corporal, sedação, diminuição de capacidade de tarefas psicomotoras e cognitivas, sonolência, diminuição da tensão arterial, distúrbios visuais, confusão, tonturas, descontrole gastrointestinal e retenção urinária, podendo, em alguns casos, conduzir a um comportamento agressivo por parte do consumidor.^{6,13} Sendo passível de provocar dependência, são também descritos sintomas de desintoxicação, nomeadamente dores de cabeça, tensão nervosa, ansiedade, dores musculares e fotossensibilidade, entre outros.^{4,6,13}

2.8.4. Determinação Analítica

O rastreio analítico de flunitrazepam em urina é ainda possível 72 horas após a ingestão, baseado em imuno-ensaios específicos para benzodiazepinas.^{4,19} No entanto, como as quantidades consumidas são baixas e a sua taxa de distribuição e metabolização é muito elevada, podem resultar em falsos negativos.^{6,19,78} Nestes casos, é aconselhada a utilização prévia da enzima β -glucuronidase, tendo sido obtidos resultados mais fiáveis após a acção de hidrólise enzimática.⁴² A confirmação e quantificação do flunitrazepam e do seu metabolito principal, o 7-amino-flunitrazepam, poderão ser efectuadas por GC/MS, existindo métodos baseados em ionização por impacto electrónico e métodos baseados em ionização química, embora a utilização de HPLC seja também possível.^{6,42,60,77,78} Em amostras *post-mortem* as nitrobenzodiazepinas, onde se inclui o flunitrazepam, poderão ser convertidas nos seus 7-amino-metabolitos, tornando-se essencial, então, a determinação do seu metabolito, o 7-aminoflunitrazepam.^{51,60,88} Esta questão pode ser minimizada, pelo menos parcialmente, com a congelação das amostras a -20°C.⁸⁸

2.9. 3,4-Metilenodeoximetanfetamina (MDMA)

2.9.1. Caracterização

A 3,4-metilenodeoximetanfetamina (MDMA), usualmente designada como *Ecstasy*, foi desenvolvida pela empresa *Merck*TM em 1914 como composto primário para a produção de produtos farmacêuticos.^{4,6,19,34} Embora tenha sido criada com o objectivo de

funcionar como supressor de apetite, os testes realizados em animais não foram convincentes, tendo sido abandonado o seu desenvolvimento.^{4,5} Difundida nos anos 60 e 70 como substância estimulante e potenciadora dos estímulos e experiências sensoriais característicos da época em causa, a MDMA foi também usada como facilitadora da psicoterapia, favorecendo estados de introspecção e de comunicação com outros indivíduos.^{5,6,13,19,34} No entanto, os casos de intoxicação surgiram em força e foi declarada ilegal.^{6,13,34,60}

Actualmente, a MDMA é produzida em laboratórios clandestinos, maioritariamente na Europa e Estados Unidos da América.⁶ Com diversos “nomes de rua” associados (*ecstasy*, *XTC*, *E*, *X*, *Adam*, *Droga do Amor*), é normalmente consumida em cápsulas ou *tabletes*, embora também tenham sido descritas situações de consumo por via nasal ou injectável.^{13,34,80} Sendo disponibilizada maioritariamente em pastilhas, estas encontram-se normalmente “adulteradas” com diversas substâncias de corte, nomeadamente cafeína, dextrometorfano, pseudoefedrina, LSD, parametoxianfetamina (PMA), parametoximetanfetamina (PMMA), metilendioxianfetamina (MDA), N-etil-3,4-metilenodioxianfetamina (MDEA) e 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (2-CB).

A MDMA é uma droga sintética, psicoactiva e quimicamente similar à metanfetamina e ao alucinogéneo mescalina. Tal facto leva ao surgimento de efeitos secundários desagradáveis frequentemente inesperados, até porque algumas das substâncias misturadas apresentam toxicidade superior à MDMA, podendo inclusivamente conduzir à morte do seu consumidor.^{4,6,8,81-83} A MDMA também é consumida conscientemente em conjunto com outras substâncias, nomeadamente álcool, anfetaminas, e/ou marijuana, entre outras. Apresenta-se como a *club drug* mais popular em todo o mundo ocidental (Europa e Estados Unidos da América). O mercado que rege este tipo de substâncias, denominadas *designer drugs*, é, na actualidade, um dos principais problemas a enfrentar pelos programas mundiais de luta contra o tráfico de substâncias ilícitas.^{12,19,84,85}

2.9.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

A MDMA é um estimulante do Sistema Nervoso Central. Provoca um aumento na produção e libertação de serotonina pré-sináptica, inibindo, igualmente, a sua recaptura.^{4,5,14,34} É um agonista indirecto da serotonina, inibindo a hidroxilase do

triptofano, responsável pela produção de serotonina. Essa inibição leva à produção forçada de serotonina e bloqueio simultâneo da sua reabsorção.¹³ Sendo a serotonina um mediador de diversos factores do comportamento (regulação do humor, memória, função cognitiva, controle dos impulsos, apetite e sono), as alterações provocadas pela presença da MDMA justificam o seu efeito psicotrópico. São também consequências o aumento da tensão arterial e pulsação cardíaca.^{4,34} O consumo deste composto conduz também à libertação de dopamina e norepinefrina, conjuntamente com a serotonina, a partir dos neurónios pré-sinápticos, impedindo o seu metabolismo através da inibição da monoamina-oxidase.^{4,6,14,16} O resultado é caracterizado por um aumento brusco de neurotransmissores na sinapse, supondo-se que o excesso de dopamina e serotonina sejam os responsáveis pelos efeitos alucinogénicos.⁶ Alguns autores referem uma influência sobre o sistema de neurotransmissão colinérgico¹³, funcionando também como potenciador da libertação da noradrenalina e da acetilcolina.¹⁴

2.9.3. Sintomatologia

Os efeitos desejados associados ao consumo de MDMA envolvem sensações de boa disposição generalizada, empatia social aumentada, com consequentes sensações de intimidade, quer com os parceiros do grupo, quer com indivíduos desconhecidos, ansiedade reduzida, estímulos visuais alterados, picos emocionais, sensação de energia corporal e física inesgotável, aumento dos índices de extroversão e auto-confiança.^{4,6,13,14,34,85,86} Este aumento de índices de sociabilidade associados à substância leva alguns autores a defender a criação de uma classe distinta de drogas, designadas “empatogénicas”, “simpatomiméticas” ou “entactogénicas”.^{14,19,86,87} Apesar de possuir uma estrutura semelhante à da anfetamina e mescalina, a MDMA não demonstra capacidades estimulantes e “viciantes” tão elevadas, e as suas consequências psicóticas não são tão profundas quanto as provocadas pelo LSD ou outros alucinogénicos.^{4,86} Não apresenta, em princípio, sinais de dependência física.¹³

Os efeitos indesejáveis associados ao consumo de MDMA envolvem o tremer dos maxilares e ranger de dentes incontrolláveis, quadros psíquicos de despersonalização, depressão, ansiedade e quadros paranóides, linhas de pensamento rápidas e desconexas, incapacidade de tomadas de decisão, arritmias, hipertensão, secura bocal, parkinsonismo,

esoforia, falta de apetite, dores de cabeça regulares, caminhar alterado, transpiração elevada e retenção urinária.^{4-6,13,14,16,19,34,87}

Os efeitos da MDMA envolvem neurotoxicidade serotoninérgica, quer em estudos em animais, quer em alguns estudos em humanos. Foi verificada a destruição de axónios e de terminais axónicos associados à serotonina. Estão reportadas situações identificadas de insuficiência hepática fulminante ou hiponatremia. Arritmias, hipertensão e enfarte estão também identificados.^{5,9,13,34,80,87} Não será de descurar, no entanto, a acção combinada de outras substâncias normalmente associadas, quer outras drogas ilícitas, quer adulterantes ou compostos “de corte”, utilizadas na preparação das pastilhas.^{34,86}

A própria farmacocinética da MDMA não apresenta uma proporcionalidade com a quantidade administrada. Assim, pequenos aumentos na quantidade de substância administrada representam grandes alterações na concentração sanguínea, aumentando, em muito, o risco de toxicidade. Efectivamente, a cinética não-linear da MDMA, associada a doses elevadas e com pequenas diferenças de tempo a separá-las poderá conduzir a concentrações sanguíneas de MDMA extremamente altas, com os efeitos adicionais indesejáveis a surgirem rapidamente.^{16,34,86}

A acção da MDMA sobre os canais de produção/controle de serotonina e dopamina será a responsável pela desregulação do controle da temperatura corporal, com um aumento da mesma até ao surgimento de falha renal, enfarte ou desidratação.^{4,8,34} A ingestão de MDMA conduz a um aumento directo de produção da hormona anti-diurética. O calor produzido com a actividade excessiva (dança frenética em local fechado com a presença de elevado número de frequentadores) associado à síndrome de hipertermia provocado pela própria substância traduz-se num consumo exagerado de água devido à desidratação.^{4,9,13,16} Os efeitos neurológicos incluem confusão, delírio, paranóia, dores de cabeça, anorexia, depressão, insónia, irritabilidade e nistagmo, podendo manifestar-se várias semanas após o consumo.^{4,6,8,16,86} Este tipo de efeitos neurológicos poderão surgir de uma forma súbita logo após a ingestão ou poderão surgir meses depois, podendo prolongar-se ao longo de um intervalo alargado de tempo.

A hepatotoxicidade associada à MDMA é rara e pode variar entre episódios únicos e pouco significativos até falha hepática fulminante com necessidade de transplantação.^{6,16} Alguns dos casos surgem de necrose devida à hipertermia, enquanto outros surgem da

acção directa da substância sobre as células do fígado.¹⁶ No entanto, ainda não se encontra totalmente compreendido o fenómeno de influência da substância a nível hepático.⁹

Surgiram nos últimos tempos alguns estudos que procuram associar o consumo regular de MDMA com dificuldades e sequelas neurológicas de longo prazo, tendo sido identificadas situações de falhas nas funções verbal e de focagem visual, dificuldades na recordação e utilização da palavra, capacidade de atenção, concentração e memória “de trabalho”, mesmo passado algum tempo.^{9,8,12,86} No entanto, estes estudos apresentam uma limitação: quando há consumo de múltiplas substâncias, nem sempre é possível separar os efeitos por substância, ficando o resultado clínico final associado aos efeitos conjugados do consumo total.^{12,86} Não sendo eticamente possível efectuar estudos controlados de efeitos a longo termo da MDMA, ainda muito está por descobrir em termos da sua neurotoxicidade.⁹ Os efeitos associados ao consumo do composto surgem 30 a 60 minutos após o consumo oral, podendo manter-se as suas sensações até 8 horas após consumo.^{4,6,88}

2.9.4. Determinação Analítica

A detecção analítica de MDMA pode ser efectuada em amostras de urina e sangue por testes imunológicos específicos, quer para a MDMA, quer para anfetaminas ou metanfetaminas, dependendo, como se depreende, da reactividade cruzada da molécula com o teste utilizado. Para a confirmação de um rastreio por imuno-ensaios positivo utiliza-se a análise por GC-MS. Alguns autores referem a detecção de MDMA em urina até 72 horas após o consumo, sendo referido um $T_{1/2}$ no sangue de aproximadamente 8 horas.^{6,88} No entanto, um estudo elaborado com imuno-ensaios em urina apresentou resultados falsos-negativos na ordem de 1 em cada 3, embora a reactividade cruzada com os testes de anfetaminas possa surgir se as concentrações forem elevadas. Mesmo assim, novos procedimentos de imuno-ensaios têm surgido, na tentativa de tornar estes testes mais sensíveis, tentando minimizar a perda de especificidade.¹⁹

A MDMA não apresenta capacidade de formação de derivatizados estáveis quando se utiliza o BSTFA como reagente de derivatização, o que dificultará o desenvolvimento e aplicação, a este composto, do procedimento de derivatização testado. A análise por GC-MS do composto não derivatizado não se mostra também uma solução passível de ser utilizada, já que a literatura consultada refere perdas consideráveis de sensibilidade e

tailing dos picos cromatográficos. Os próprios picos-base das anfetaminas incluem massas relativamente baixas, com elevada influência do ruído cromatográfico. Ao nível do procedimento de extracção de MDMA, surgem na literatura sugestões de extracção líquido-líquido, SPE e SPME. Em termos de métodos instrumentais de análise, é sugerida como alternativa a detecção por LC-MS, GC-MS com ionização química positiva, sendo considerados diversos compostos da grande família das anfetaminas, e/ou a utilização de métodos de derivatização alternativos, nomeadamente a acetilação, com as suas limitações associadas (impossibilidade de injeção directa da amostra, diminuição do tempo de vida da coluna) ou a sililação com MTBSTFA.^{58,60,66,77,80-82,84,86,87,89}

2.10. Metadona

2.10.1. Caracterização

A metadona é um opiáceo sintético, semelhante ao propoxifeno, do grupo das fenilheptilaminas.^{69,75,76} Foi desenvolvido na Alemanha durante a II Guerra Mundial, devido à falta generalizada de morfina, mas devido ao seu tempo de semi-vida longo acabou por ser abandonada.⁶⁰ Posteriormente, a metadona tornou-se muito usada em situações clínicas de alívio da dor, na terapia de substituição em toxicodependentes consumidores de opiáceos, através de programas de manutenção acompanhada e como droga recreativa. Nas terapias de substituição, continua a ser a substância mais usada e mais estudada, com um conjunto de efeitos a curto e a longo prazo descritos até à exaustão.^{60,75,90-92} Embora apresente resultados credíveis ao nível da diminuição dos efeitos clínicos, infecciosos e mesmo legais e sociais dos consumidores de heroína, a prescrição de metadona continua a ser, ainda hoje, controversa, quanto mais não seja pela sua utilização com dependência permanente da substância e não com um efeito curativo da dependência de opiáceos. Como droga recreativa, a metadona é usada devido, justamente, aos seus efeitos sedativos e analgésicos.^{60,76,92}

2.10.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

A metadona exerce a sua acção sobre o Sistema Nervoso Central, actuando como agonista dos receptores μ dos opiáceos de longa duração, tendo como objectivo a indução de efeitos analgésicos, sedativos e anti-tússicos.^{75,76,91,92} A sua cadeia metabólica envolve uma desmetilação no fígado e ao nível do sistema gastro-intestinal, envolvendo uma catálise pelo citocrómo P450. Obtêm-se dois metabolitos farmacologicamente inactivos, denominados EDDP (2-etiledeno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina) e EMDP (2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina).⁹²

Contrariamente à generalidade dos opiáceos, a metadona apresenta uma boa taxa de absorção por via gastro-intestinal, o que aumenta o seu tempo de semi-vida (15-60 horas) e diminui os efeitos de tolerância e privação/desintoxicação.⁷⁵

2.10.3. Sintomatologia

Os primeiros efeitos da metadona são comuns ao grupo dos opiáceos, incluindo a sedação, depressão do Sistema Nervoso Central, tonturas, euforia e alteração da percepção sensorial, nomeadamente da dor, com efeitos dissociativos.^{75,76} Estão também descritos como sintomas dores de cabeça, vermelhidão da face, sudação elevada, náuseas e vómitos, miose, flacidez e incapacidade de resposta muscular, sono irregular e incapacidade de concentração. Em doses mais elevadas, onde poderá surgir uma situação de *overdose*, surgem sintomas de inanição, convulsões, sonolência extrema, depressão respiratória, coma e morte.⁷⁶

2.10.4. Determinação Analítica

Na quantificação por GC/MS, a metadona apresenta dificuldades associadas ao seu ião mais abundante (72 m/z). A interferência de ruído químico, mais comum nas massas mais baixas, poderá conduzir à necessidade de escolha de um outro ião, característico da substância, para quantificação. A alternativa poderá passar pela determinação e quantificação por LC-MS.^{58,60,77}

2.11. Buprenorfina

2.11.1. Caracterização

A utilização da metadona como substituto de opiáceos em indivíduos em tratamento de desintoxicação com terapêutica de substituição tem sido contestada, desde os primeiros tempos de aplicação, devido aos seus efeitos secundários e respectivas consequências, o que conduziu à procura de outras farmacoterapias alternativas para a dependência de Opiáceos.^{93,94}

Nos últimos anos, tem surgido um conjunto de evidências e factos que procuram comprovar a eficiência da buprenorfina como substância usada na terapia de substituição prevista em programas de desintoxicação de toxicodependentes.^{90,95} A vantagem de apresentar uma relativa segurança em situações de *overdose*, associada à possibilidade de ser consumida em intervalos de tempo superiores, torna-a uma substância a ser considerada em programas de desintoxicação de toxicodependentes.^{90,94} Os efeitos de abstinência são minorados, em comparação com a metadona, tendo, ainda, a mesma eficácia na terapêutica de substituição da heroína, tornando mais fácil a sua venda, distribuição e consumo.^{90,93} Ao nível da utilização recreativa, a buprenorfina é também procurada pelos seus efeitos associados a uma sensação de euforia.⁹⁶ No entanto, o aumento regular do seu consumo, lícito ou ilícito, associado ao consumo de diversas substâncias ilícitas, tem trazido um aumento significativo no número de casos forenses descritos com a presença de buprenorfina.⁹⁷

A buprenorfina é um opiáceo semissintético, semelhante à metadona, obtido a partir da tebaína.^{60,93,95} Podendo ser consumida por via intravenosa ou através de comprimidos sublinguais,⁹⁶ a fama da buprenorfina levou também a um aumento da sua procura nos mercados ilícitos, com diversos objectivos, salientando-se a procura de prazer, a potenciação dos efeitos de outras substâncias ou a tentativa de auto-desintoxicação.⁹⁸ É também consumida, conjuntamente com benzodiazepinas, nomeadamente o flunitrazepam, como alternativa ao consumo de heroína, obtendo-se sensações semelhantes.^{94,95}

2.11.2. Mecanismo de Acção e Metabolismo

A buprenorfina apresenta um efeito analgésico até 40 vezes superior à morfina, com actividade agonista e antagonista nos receptores centrais de opiáceos.⁹³⁻⁹⁵ A buprenorfina é agonista dos receptores μ dos opiáceos, agonista de baixa afinidade do receptor opióide da nociceptina 1 (ORL1) e antagonista dos receptores κ e δ dos opiáceos.^{60,94,99} É de notar que a sua eficácia terapêutica de longa duração contra a dependência da heroína deve-se, certamente, à sua elevada afinidade com os receptores μ dos opiáceos.⁹³

2.11.3. Sintomatologia

A sintomatologia da buprenorfina é comum à maioria dos opiáceos, incluindo a sedação, depressão do Sistema Nervoso Central, tonturas, euforia e alteração da percepção sensorial, nomeadamente da dor, com efeitos dissociativos. A *overdose* poderá ser caracterizada por confusão, tonturas, dilatação das pupilas, alucinações, queda de tensão arterial, insuficiência respiratória, coma e morte.^{75,76,100}

2.11.4. Determinação Analítica

A buprenorfina não apresenta grandes dificuldades ao nível da sua determinação por GC-MS, embora também seja proposta a sua determinação por LC-MS. O seu elevado peso molecular e a sua estabilidade em termos de armazenamento serão, provavelmente, as suas características mais identificáveis. Com as amostras armazenadas a -20°C , a buprenorfina mantém-se estável ao longo de, pelo menos, um ano.^{58,60,97,100}

3. Metodologia Analítica em Toxicologia Forense

Os três principais objectivos de uma análise toxicológica incluem a detecção de eventuais compostos de algum modo agressivos para a amostra ou organismo estudado, a identificação desses mesmos compostos e a determinação da quantidade de composto presente na amostra analisada.¹⁰¹

A detecção de substâncias em amostras *post-mortem* traz dificuldades, comparativamente com as amostras de origem clínica, obrigando a uma abordagem diferenciada e específica das mesmas, quer ao nível da amostragem *de per se*, quer ao nível do tratamento e preparação das amostras, quer, inclusivamente, ao nível dos resultados obtidos e respectiva interpretação. Todos os passos associados à recolha, identificação, manuseamento e armazenamento eficaz das amostras estão interdependentes e deverão estar controlados pormenorizadamente. De facto, na generalidade, e cingindo-nos a questões analíticas, as amostras *post-mortem* estão sujeitas a possíveis alterações devidas a autólise ou metabolização externa de origem bacteriana, podendo alterar a quantidade de substância presente na amostra estudada ao longo do tempo.^{51,88,102,103}

Como já foi salientado atrás, o desenvolvimento de procedimentos que rastreiem diversas substâncias de forma sistemática e eficaz torna-se um forte apoio para a exclusão de envolvimento das mesmas na causa de morte, ou da sua influência no comportamento de um indivíduo, em situação de avaliação clínica.^{21,104} Em qualquer dos objectivos associados, as amostras preferenciais serão sempre a urina e o sangue total.⁸⁸

A selecção das amostras adequadas e relevantes para as determinações analíticas em causa e respectiva conservação são, na actualidade, determinantes para uma investigação toxicológica de qualidade, com resultados fiáveis e com interesse para a resolução dos casos em estudo.²

O sangue total é a amostra preferencial para a quantificação das substâncias encontradas, eventuais metabolitos, e respectiva interpretação de valores.^{2,51} As vantagens de utilização do sangue total incluem a possibilidade de efectuar um teste de rastreio e posterior confirmação e quantificação na mesma amostra, detectar a presença do composto inicial no organismo, para além de eventuais metabolitos, e relacionar directamente os valores calculados para determinado composto com a associação a um possível estado de influenciado.⁸⁴ A quantificação deverá ser efectuada, sempre que possível, em sangue

periférico (veia femoral, por exemplo), minimizando, assim, eventuais alterações de concentração associadas a uma redistribuição da substância *post-mortem*, fenómeno geralmente aceite e até descrito para muitos compostos de interesse forense.^{51,53,88}

A urina surge como “depósito” de substâncias e respectivos metabolitos em concentrações elevadas, após exposição ou abuso das mesmas, facilitando a sua detecção. Esta amostra funciona, então, como meio de rastreio fundamental, podendo transmitir algumas indicações relativas à exposição do indivíduo em causa a uma ou várias substâncias, não existindo, no entanto, uma correlação directa entre a concentração determinada na urina e os efeitos farmacológicos da substância encontrada no momento da recolha da amostra.^{2,51}

A determinação analítica das substâncias estudadas neste trabalho já é referida de forma individualizada em bibliografia diversa, através de diversos procedimentos analíticos, encontrando-se, até, diferentes propostas para os procedimentos de extracção e de derivatização química e a utilização da cromatografia gasosa ou cromatografia líquida, usualmente associadas à detecção por espectrometria de massa, mas podendo incluir outros tipos de detectores (ECD, NPD, FID,...).

3.1. Extracção em Fase Sólida

Um método de extracção aceitável deverá permitir um isolamento e uma concentração eficientes das substâncias a determinar, permitindo, paralelamente, a eliminação de interferentes originários da matriz da amostra em estudo. A extracção é, na actualidade, um dos passos fulcrais no sucesso de um procedimento analítico, para uma identificação positiva da(s) substância(s) em estudo em amostras biológicas, já que sem um processo de extracção eficiente, todo o procedimento perde a sua aplicabilidade.^{101,103,105,106}

Embora a maior parte dos trabalhos publicados apontem para procedimentos optimizados para uma só substância ou grupo de substâncias com características semelhantes, a adopção de análises toxicológicas sistemáticas pretende, de uma forma mais ou menos eficiente, encontrar um compromisso entre uma capacidade de recuperação aceitável e compatível com a gama de trabalho desejada, a remoção adequada de interferentes da matriz, e uma abrangência de substâncias mais heterogénea.¹⁰¹

A Extração em Fase Sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) é utilizada quotidianamente para amostras de urina e de sangue total, apresentando diversas vantagens, nomeadamente: um baixo consumo de solventes orgânicos, com consequente diminuição de volumes de resíduos e de libertação de substâncias voláteis e perigosas em contacto com os operadores; maior selectividade; maior reprodutibilidade; eficiência de extração muito elevada com pequenas quantidades de amostra e possibilidade de automatização do processo.^{103,106}

A SPE é uma técnica extractiva baseada na partição selectiva de um ou mais componentes entre duas fases, em que uma delas é um sólido.² A natureza da fase sólida pode ser variável, permitindo a extração de diferentes classes de compostos, atendendo às suas características de polaridade e comportamento químico. Assim, além de interações de Van der Waals, podem ser utilizadas pontes de hidrogénio ou interações electrostáticas como meio de separação e isolamento de determinada classe de compostos, extraíndo-os de uma amostra aquosa (como são exemplos a urina e o sangue total). Após a retenção dos compostos de interesse, é efectuada uma eluição utilizando um solvente orgânico para posterior análise cromatográfica.¹⁰⁵

Para controlar adequadamente todo o procedimento, torna-se necessária a escolha de um padrão interno compatível com os compostos a determinar. Essa compatibilidade pode ser traduzida por um comportamento analítico fiável, que permita uma boa quantificação e permita minimizar erros associados aos procedimentos extractivo, de derivatização e cromatográfico.¹⁰⁶

A sequência normal para um procedimento de extração por SPE envolve, em geral quatro passos (Figura 11):

Condicionamento da Coluna: efectuada antes da passagem da amostra, permite “preparar” a fase sólida para a recepção da matriz, garantindo condições reprodutíveis de retenção do composto de interesse. Para tal, faz-se passar um ou mais solventes orgânicos, puros ou em misturas, mediante as características da fase estacionária utilizada e dos compostos a isolar.¹⁰⁵

Retenção do Analito: corresponde à passagem da amostra pela fase sólida com retenção dos analitos de interesse e, eventualmente, de outras substâncias constituintes da amostra (interferentes).¹⁰⁵

Lavagem da Coluna: este passo permite a eliminação de substâncias interferentes por eluição da coluna com um ou mais solventes de polaridade adequada,¹⁰⁵ melhorando o isolamento dos analitos procurados. Assim como nos outros passos, um ou mais solventes orgânicos são adicionados à coluna, recolhendo as substâncias com as quais apresentem maior afinidade.¹⁰⁵

Eluição do Analito: Este último passo permite a remoção do analito da fase sólida onde se encontrava retido, usando para isso um eluente com o qual o analito tenha uma afinidade adequada. Neste passo, algumas substâncias interferentes poderão manter-se ligadas à fase sólida, contribuindo assim para um extracto o mais purificado possível.¹⁰⁵

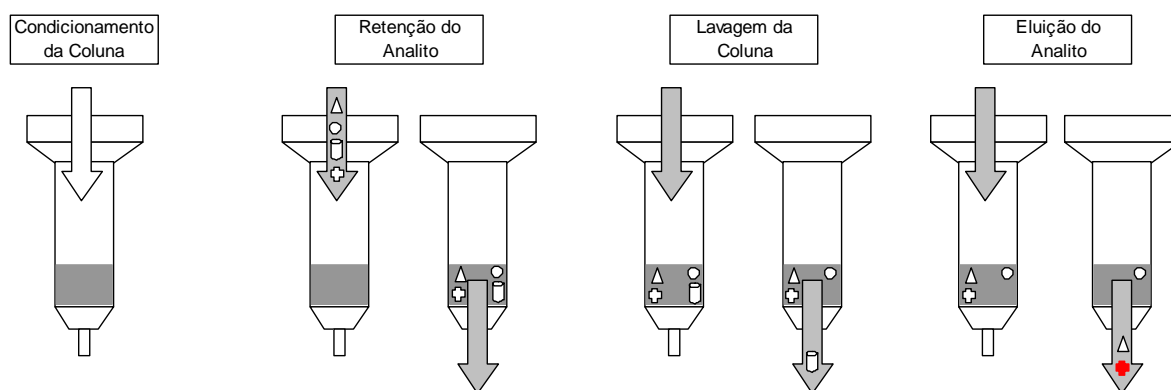


Figura 11 – Procedimento normal de Extração em Fase Sólida (SPE). A branco os interferentes da matriz e a vermelho o analito de interesse.

A diversidade de suportes sólidos é, na actualidade, a grande mais-valia deste tipo de procedimento. As designadas “fases universais” permitem, através da sua polivalência de constituição e de comportamento, reter diversas classes de analitos, apresentando, em paralelo, características hidrofílicas, hidrofóbicas e de troca iónica, tornando muito maior a abrangência da sua aplicação.^{60,105}

O uso de fases de natureza polimérica, em alternativa à sílica, é vantajoso na medida em que estas são estáveis numa gama alargada de pH, o que alarga a abrangência quer de amostras passíveis de ser utilizadas, quer de compostos passíveis de ser isolados. Realce-se, também, a possibilidade de se poder evitar a utilização da sílica, que poderia interagir com iões metálicos, ou outras espécies catiónicas, o que diminuiria a sua selectividade. A própria estrutura das partículas poliméricas é facilitadora de uma

estabilidade e reprodutibilidade melhoradas, já que a sua forma regular apresenta-se mais estável do que a forma irregular das partículas de sílica.¹⁰⁵

Na metodologia otimizada ao longo deste trabalho, vai ser utilizada uma coluna que apresenta um co-polímero reticulado de *N*-vinilpirrolidona e divinilbenzeno parcialmente sulfonado. O comportamento, denominado *mixed-mode*, resulta da presença de grupos com propriedades físico-químicas diferentes na mesma fase sólida, permitindo a obtenção de diferentes resultados, consoante os solventes e os passos utilizados. Assim, e no caso presente, para além das propriedades de extracção hidrofóbica e hidrofílica associadas ao co-polímero utilizado, os grupos sulfónicos vão fornecer propriedades de troca iónica, permitindo a retenção de compostos básicos, ácidos e neutros (Figura 12).^{60,101,105,107,108}

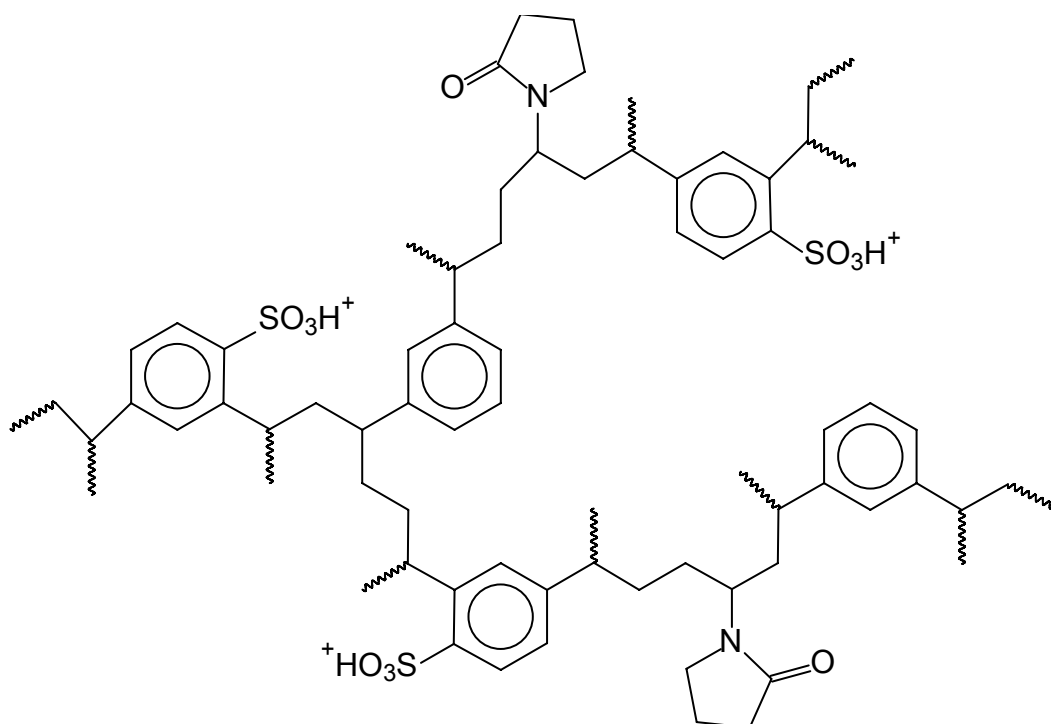


Figura 12 – Estrutura da resina da coluna MCX da OASIS

O procedimento de extracção estudado, que será descrito no capítulo 4.3, foi escolhido por se apresentar como um “método generalista”, pretendendo-se abranger a grande variedade de comportamentos dos diversos analitos estudados. No entanto, na literatura consultada, apenas foram encontradas duas referências considerando a utilização desta coluna para o isolamento do GHB e da GBL^{35,37} e uma referência que sugere a utilização desta coluna para a determinação da MDMA.⁸²

Conforme referido acima, a escolha de um método generalista tem como objectivo ultrapassar ou minimizar os diferentes comportamentos químicos dos analitos estudados. Sendo o pKa dos compostos-alvo um dos factores influenciadores do sucesso de um bom método de extracção, torna-se fundamental observar os seus valores com alguma atenção. Na Tabela 1 são apresentados os valores de pKa dos compostos estudados.²² Não foi possível obter o valor de pKa do 7-aminoflunitrazepam, no entanto, é sugerido pela literatura que o seu valor não será muito diferente do valor do Flunitrazepam.⁷⁸

Tabela 1 – Valor de pKa dos analitos estudados

Composto	pKa
Buprenorfina	8,5
Flunitrazepam	1,8
7-Aminoflunitrazepam	ND
GHB	4,72
GBL	/
Ketamina	7,5
Metadona	8,3
PCP	8,5
Propoxifeno	6,3

A grande variedade de pKa's verificada vem, assim, justificar a escolha de um método abrangente, que permita recolher compostos com comportamento ácido, neutro e básico, com um rendimento aceitável para o fim em vista.

3.2. Derivatização Química

A derivatização analítica encontra aplicações nos vários ramos da Química moderna. Esta técnica permitiu a análise, por cromatografia gasosa e mesmo por cromatografia líquida, de um grande número de compostos que, de outra forma, não poderiam ser analisados por estes métodos.¹⁰⁹

Uma derivatização bem sucedida deverá obedecer aos seguintes requisitos:⁶⁶

- A reacção de derivatização deverá ser simples, rápida e com elevado rendimento;
- Originar um só composto derivatizado por cada analito;
- O composto derivatizado deverá ser estável nas condições de análise;

- A curva de calibração deverá apresentar um comportamento linear, para efeitos de quantificação, permitindo uma boa adequação à mesma dos pontos obtidos.

A derivatização química pode ser utilizada com dois objectivos fulcrais: permitir a separação analítica de compostos que, de outra forma, não seriam detectáveis devido, por exemplo, a uma baixa volatilidade ou estabilidade e/ou otimizar a resposta analítica de um composto pela obtenção de comportamento cromatográfico ou detectabilidade melhorados.¹⁰⁹

A “volatilização” de compostos pouco voláteis é a razão mais comum para a utilização de técnicas de derivatização química em análise por GC. A baixa volatilidade de muitos compostos resulta da presença na sua estrutura de grupos funcionais de elevada polaridade (COOH, N–H, O–H, S–H, etc). A funcionalização adequada destes grupos permite diminuir a sua polaridade, aumentando, consequentemente, a volatilidade do composto.^{66,109}

A situação oposta também é possível: para compostos de muito baixo peso molecular, a sua excessiva volatilidade pode tornar-se um problema. Assim, a derivatização química permitirá aumentar a sua massa molecular, diminuindo a sua volatilidade e permitindo uma separação cromatográfica mais eficiente.^{66,109}

A instabilidade térmica de alguns compostos é outra razão para proceder à sua derivatização, de modo a permitir a sua determinação analítica por cromatografia gasosa.^{66,109}

Outras situações que podem exigir a derivatização química envolvem, por exemplo, a obtenção de picos não simétricos, devidos a efeitos de adsorção da coluna. A tendência de amostras polares adsorverem aos locais activos, quer da coluna, quer da mistura de suporte da mesma, conduz também à utilização de procedimentos de derivatização química, no sentido de minimizar estes efeitos.^{66,109} Compostos químicos com comportamentos cromatográficos semelhantes podem também ser separados através de técnicas de derivatização adequadas.^{66,109}

A derivatização química pode ter também um papel essencial na análise por GC-MS. A derivatização poderá permitir obter compostos com padrões de fragmentação característicos em contraponto com fragmentações pouco específicas dos compostos não

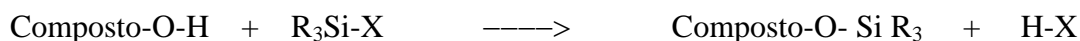
derivatizados, favorecendo a identificação inequívoca e, eventualmente, a selectividade e sensibilidade na quantificação do composto, nomeadamente com recurso à detecção em modo selectivo de iões (SIM – *Selected Ion Monitoring*).^{66,109}

3.2.1. Derivatização por Sililação

A sililação (e mais especificamente a trimetilsililação) é, sem sombra de dúvida, um dos procedimentos de derivatização mais comuns a nível de utilização para GC-MS.⁶⁶

Os derivados trimetilsililados são formados por funcionalização de grupos polares (COOH, N–H, O–H, S–H, etc...) com um grupo trimetilalquilsililo (Equação 1).^{66,109}

Equação 1 – Reacção de Sililação



Na metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho, os compostos em estudo serão derivatizados por trimetilsililação, por reacção com a *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) como catalisador, mistura de derivatização muito comum em GC-MS.¹⁰⁹

Como foi referido, as reacções de derivatização devem apresentar rendimentos elevados.¹⁰⁹ Para atingir esse objectivo, em geral são usados agentes de derivatização de elevada reactividade e em grande excesso. No entanto, a utilização de um padrão interno com comportamento semelhante ao dos analitos, face ao sistema reaccional de derivatização, permitirá compensar de forma mais efectiva eventuais perdas de recuperação durante esta etapa. A solução ideal envolverá, no caso da análise por GC-MS, e em particular com detecção em modo SIM, a utilização do próprio analito marcado isotopicamente (correntemente com grupos deuterados) como padrão interno.^{104,106,109-111}

3.3. Validação de Métodos em Análise Química

Um trabalho analítico credível tem que se basear em fundamentos cuidados, para que os dados obtidos correspondam efectivamente a valores reais. Assim, se o desenvolvimento de uma técnica analítica não incluir parâmetros de qualidade analítica, dificilmente fornecerão dados com um significado real.¹¹²

A utilização de métodos de ensaio analítico envolve uma manipulação da amostra tal que poderá conduzir a erros, os quais levarão a uma alteração do valor do resultado final que poderá ser relevante ou significativa.¹¹³ Para combater este problema, é necessário que qualquer método laboratorial seja validado utilizando critérios objectivos, de forma a demonstrar, inequivocamente, a credibilidade e a adequação dos resultados obtidos.^{112,113} O procedimento de validação em si consiste em legitimar a utilização do método proposto, visando eliminar, diminuir ou controlar todos os factores que possam conduzir a uma imprecisão ou inexactidão de um determinado valor obtido.¹¹²

O desenvolvimento de um método interno de ensaio traduz-se pela adaptação de um método previamente validado / norma de ensaio ou pela “criação” de um novo método a partir de “uma folha em branco”. Nesse sentido, a validação desse mesmo procedimento apresenta vários passos, que serão obrigatoriamente cumpridos, para a aprovação do mesmo. Torna-se também necessária a descrição e caracterização detalhadas do mesmo, de modo a poder ser executado por outro operador.¹¹³

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e dos objectivos do mesmo. No método desenvolvido, será considerado o estudo e determinação dos seguintes parâmetros: gama de trabalho e respectiva linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, repetibilidade, sensibilidade e capacidade de recuperação do procedimento de extracção.^{112,113}

O desenvolvimento de todos estes conceitos será feito paralelamente à apresentação dos resultados obtidos.

4. Material e Métodos

O método desenvolvido e testado baseia-se em técnicas de ensaio conhecidas, mas cuja aplicação ao conjunto de compostos em estudo não foi encontrada na literatura.¹¹³

O método desenvolvido foi testado e validado para amostras de sangue total e de urina, tendo como intenção a determinação qualitativa e quantitativa de GHB, GBL, fenciclidina, metadona, propoxifeno, cetamina, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam e buprenorfina nas amostras referidas.

4.1. Material Utilizado

Na Tabela 2 são descritos os produtos químicos utilizados, com respectivas referências e fornecedores.

Tabela 2 – Produtos químicos utilizados na preparação de amostras

Tipo de Produto	Produto	Fórmula Química	Empresa	Referência
Solventes e reagentes para a preparação de soluções	Metanol <i>Gradient Grade</i>	CH ₃ OH	Merck	1.06007.1000
	Acetonitrilo	CH ₃ CN	Merck	1.00030.1000
	Acetato de Etilo	C ₄ H ₈ O ₂	Merck	1.00868.1000
	Ácido Clorídrico Titrisol®	HCl	Merck	1.09970.Titrisol
	Amónia 25%	NH ₃	Merck	1.0548.1000
	Água Ultrapura	H ₂ O	Millipore	-
Reagente de Derivatização Química	BSTFA com 1% de TMCS	CF ₃ C=NSi(CH ₃) ₃ OSi(CH ₃) ₃ / Si(CH ₃) ₃ Cl	Supelco	3 – 3148
Gases para Cromatografia	Hélio BIP®	He	GASIN	-
Padrões dos compostos a determinar em soluções a 1000 mg/mL em Metanol ou Acetonitrilo	γ – butirrolactona (GBL)	C ₄ H ₆ O ₃	Lipomed	GBL-823-1LA
	Ácido γ – hidroxibutírico (GHB)	C ₄ H ₈ O ₃	Lipomed	GHB-538-NA-1LM
	Ácido γ – hidroxibutírico deuterado (GHB-d ₆)	C ₄ H ₂ D ₆ O ₃	Lipomed	GHB-752-NA-1LM
	Fenciclidina (PCP)	C ₁₇ H ₂₅ N	Lipomed	PCP-436-HC-1LM
	Fenciclidina deuterada (PCP-d ₅)	C ₁₇ H ₂₀ D ₅ N	Lipomed	PEP-437-HC-1LM
	d – Propoxifeno	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂	Lipomed	PPO-697-HC-1LM
	Metadona	C ₂₁ H ₂₇ NO	Lipomed	MET-637-HC-1
	Cetamina	C ₁₃ H ₁₆ ClNO	Lipomed	KET-663-FB-1LM
	Flunitrazepam	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	Lipomed	FLU-72-1LM

Tabela 2 – Produtos químicos utilizados na preparação de amostras (Continuação)

Tipo de Produto	Produto	Fórmula Química	Empresa	Referência
Padrões dos compostos a determinar em soluções a 1000 mg/mL em Metanol ou Acetonitrilo	7 – Aminoflunitrazepam	C ₁₆ H ₁₄ FN ₃ O	Lipomed	FLU-74-FB-1
	Buprenorfina	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	Lipomed	BUP-399-HC-1LM
	3,4 – Metileno-dioxi-metanfetamina (MDMA)	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	Lipomed	MDM-94-HC-1LM
	N,N – Dietilamida do Ácido Lisérgico (LSD)	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	Lipomed	LSD-397-FB-1LM

4.2. Preparação de Soluções

As soluções-stock foram adquiridas à *Lipomed*TM, tendo sido fornecidas em *vials* com 1 mL de volume, nas concentrações indicadas na Tabela 3, à exceção do flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam e metadona, que foram fornecidas em forma de pó.

A partir das soluções-stock, foram preparadas soluções de trabalho para todos os analitos em separado, por diluição em metanol ou acetonitrilo de um determinado volume adequado, estando as respectivas concentrações descritas na Tabela 3. Todas as soluções foram armazenadas e mantidas a -16° C.

Tabela 3 – Concentração das soluções-stock e soluções de trabalho dos analitos estudados

Analito	[Solução-stock] (mg/L)	[Solução de Trabalho]
γ – butirrolactona (GBL)	1000	100 mg/L
Ácido γ – hidroxibutírico (GHB)	1000	100 mg/L
Ácido γ – hidroxibutírico deuterado (GHB-d ₆)	1000	100 mg/L
Fenciclidina (PCP)	1000	1000 ng/mL
Fenciclidina deuterada (PCP-d ₅)	1000	5000 ng/mL
d – Propoxifeno	1000	10000 ng/mL
Metadona	420	10000 ng/mL
Cetamina	1000	100000 ng/mL
Flunitrazepam	1020	1020 ng/mL
7 – Aminoflunitrazepam	1100	1100 ng/mL
Buprenorfina	1000	10000 ng/mL
3,4 – Metileno-dioxi-metanfetamina (MDMA)	1000	10000 ng/mL
N,N – Dietilamida do Ácido Lisérgico (LSD)	1000	1000 ng/mL

Estas soluções foram utilizadas em todos os passos de validação do método analítico. Como padrões internos foram escolhidos os compostos deuterados GHB-d₆ e PCP-d₅, sugeridos pela literatura.^{15,25-27,30,35,37,45,47,48,61}

4.3. *Extracção em Fase Sólida*

O procedimento de extracção em fase sólida (SPE) foi aplicado a amostras (urina e sangue total) fortificadas com os compostos estudados e foi desenvolvido utilizando as colunas *OASIS[®] MCX*, fornecidas pela *WATERSTM*, e um extractor automatizado de SPE *ASPEC XL[®]*, da *GILSONTM*, segundo o método descrito abaixo:

- 1) Preparação da Amostra:
 - a) Diluir 1 mL de amostra (urina ou sangue total) em 4 mL de água destilada e desionizada;
 - i) Se a amostra é uma urina, deverá passar por um processo de hidrólise enzimática, com a adição de β -glucuronidase, seguida de aquecimento a aproximadamente 60°C durante três horas.
 - b) Adicionar 50 μ L (250 ng) de PCP-d₅ e 50 μ L (5 μ g) de GHB-d₆;
 - c) Levar ao vórtex e centrifugar 20 min a 3900 rpm;
- 2) Condicionar a coluna com 2 mL de CH₃OH.
- 3) Equilibrar a coluna com 2 mL de H₂O.
- 4) Introduzir a amostra na coluna, a um fluxo de 1-2 mL/min.
- 5) Lavagem da coluna:
 - a) 2 mL de H₂O;
 - b) 2 mL de HCl 0,1M;
 - c) 2 mL de 5% de CH₃OH em H₂O;
- 6) Secar a coluna em vácuo.
- 7) Eluição:
 - a) 2 mL de Acetonitrilo/ CH₃OH 7/3 (este passo recolhe os compostos ácidos e neutros);
 - b) 2 mL de NH₃ a 5% em acetato de etilo (este passo recolhe os compostos básicos);

4.4. Derivatização Química

Após o procedimento de extração por SPE, os eluatos oriundos das amostras fortificadas foram secos e concentrados, pela evaporação dos eluentes, em evaporador rotativo, durante três horas a 45°, sob vácuo.

Seguidamente, os extractos foram redissolvidos em 200 µL de Metanol e transferidos para *inserts* de reacção dentro de *vials*.

O processo de derivatização química envolveu a adição de 50 µL de reagente de derivatização (BSTFA+TMCS 99:1), com posterior aquecimento a 65°C durante trinta minutos.

4.5. Análise Cromatográfica

O equipamento de GC-MS utilizado foi um Cromatógrafo *Agilent 6890* equipado com um injetor automático *Agilent 7683* e uma coluna *Factor-Four VF 17-MS (Varian)* e acoplado a um Espectrómetro de Massa com um analisador de massas tipo Quadrupolar *Agilent 5973N*.

As condições cromatográficas usadas encontram-se descritas em pormenor na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições cromatográficas usadas

Injector	<i>Injector Automatizado 7683 (Agilent)</i>	
	Temperatura	300 °C
	Volume de Amostra	1 µL
	Modo de Injecção	<i>Splitless</i>
	Pressão	14,49 psi
	Fluxo de Purga (<i>purge flow</i>)	24,0 mL/min
	Tempo de Purga (<i>purge time</i>)	2 min
	Gás Utilizado	Hélio BIP
Coluna	<i>Factor Four VF 17-MS</i>	0,25 mm / 15 m / 0,25 µm
Forno	Temperatura Inicial	70°C
	Tempo Inicial	3 min
	Rampa de Temperatura	40°C/min
	Temperatura Final	290°C
	Tempo Final	6 min
	Tempo Total de Corrida	14,50 min
Espectrómetro de Massa	Linha de Transferência	280°
	Temperatura do Quadrupolo	150°C
	Temperatura da Fonte de Ionização	230°C
	<i>Solvent Delay</i>	2,50 min
	Parâmetros de Aquisição	<i>Modo SIM</i>

A aquisição dos sinais cromatográficos foi efectuada utilizando o *software Enhanced Chemstation* da Agilent.

Os espectros de massa obtidos em SCAN foram comparados com a base de dados disponível no equipamento, *Wiley Mass Spectra Libraries Ver. D.04.00* da Agilent.

Após a identificação dos compostos com base nos correspondentes espectros de massa, adoptou-se o modo de aquisição SIM (*Single Ion Monitoring*) para a quantificação dos compostos em estudo. Os grupos, ou segmentos, de tempos definidos na programação do MS e os respectivos iões seleccionados para cada um dos analitos em estudo encontram-se descritos na Tabela 5. O ião escolhido para a quantificação de cada composto encontra-se salientado em **negrito**.

Tabela 5 – Grupos de iões definidos para aquisição em modo SIM

Nome do Grupo	Tempo Inicial (min)	Iões (<i>m/z</i>)
GBL	2,51	86 , 56
GHB-diTMS + GHB-d ₆ -diTMS	3,60	117, 233 120, 239
Propoxifeno 1	4,50	91, 115, 193, 208
PCP + PCP-d ₅	6,80	91, 200 , 242, 243 96, 205 , 246, 248
Cetamina	7,26	180 , 182, 209
Propoxifeno e Metadona	7,60	58, 91, 115, 193, 208 72, 294 , 309
Flunitrazepam	8,50	238, 266, 285, 286 , 312, 313
7-aminoflunitrazepam	10,00	254, 255, 282, 283
Buprenorfina-TMS	12,80	450 , 451, 482, 506

4.6. Curvas de Calibração

As curvas de calibração foram preparadas a partir das soluções de trabalho descritas acima. Os volumes de solução retirados das soluções-*stock* correspondentes a cada nível da curva de calibração de cada composto foram pipetados directamente para os *inserts* dos *vials* de reacção. Na Tabela 6 são apresentados os analitos associados a cada Padrão Interno.

Tabela 6 – Analitos e respectivo padrão interno

Analitos	Padrão Interno
GHB	GHB-d ₆ (5 mg/L)
GBL	
Metadona	PCP-d ₅ (250 ng/mL)
Buprenorfina	
PCP	
Flunitrazepam	
7-Aminoflunitrazepam	
Cetamina	
Propoxifeno	

4.7. Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram efectuados em sangue total e urina. A sua execução implicou a adição dos diversos analitos estudados em três concentrações diferentes (Tabela 7), e respectivos padrões internos, com posterior passagem da amostra por todos os procedimentos previstos no método desenvolvido.

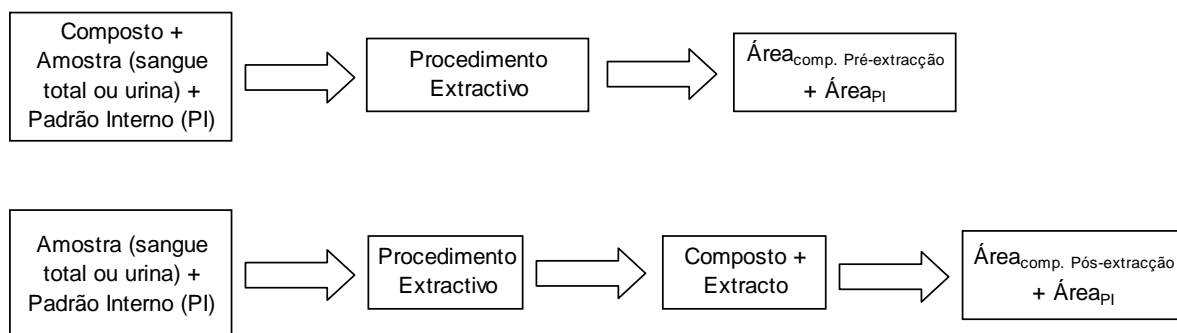
Paralelamente, foi preparada uma segunda série de amostras, onde se adicionaram apenas os padrões internos, antes do procedimento de extracção. Após esta, foram adicionados os analitos e executado o passo de derivatização química.^{114,115}

Tabela 7 – Níveis de concentração utilizados nos ensaios de recuperação

Analitos	Nível 1	Nível 2	Nível 3
GHB	1 mg/L	5 mg/L	15 mg/L
GBL	1 mg/L	5 mg/L	15 mg/L
Metadona	100 ng/mL	500 ng/mL	1500 ng/mL
Buprenorfina	50 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
PCP	15 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
Flunitrazepam	15,3 ng/mL	51 ng/mL	102 ng/mL
7-Aminoflunitrazepam	16,5 ng/mL	55 ng/mL	110 ng/mL
Cetamina	250 ng/mL	1000 ng/mL	3000 ng/mL
Propoxifeno	250 ng/mL	1000 ng/mL	2000 ng/mL

Os resultados cromatográficos obtidos foram comparados, permitindo calcular o rendimento de extracção de todos os analitos estudados.

Esta comparação encontra-se representada graficamente na Figura 13.



$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área}_{\text{comp. Pré-extracção}} / \text{Área}_{\text{PI}}}{\text{Área}_{\text{comp. Pós-extracção}} / \text{Área}_{\text{PI}}} \times 100$$

Figura 13 – Procedimento utilizado nos ensaios de recuperação para amostras de sangue total e urina e respectiva fórmula de cálculo (comp. – composto; PI – padrão interno)

5. Resultados e Discussão

5.1. Identificação dos Compostos

5.1.1. Modo de Detecção SCAN

A implementação da metodologia estudada iniciou-se com a análise por GC-MS de soluções-padrão dos compostos em estudo, em modo SCAN. Todos os compostos foram injectados em separado. Os compostos susceptíveis de derivatização química passaram pelo referido processo, nomeadamente a buprenorfina, o GHB e o GHB-d₆. Este procedimento inicial teve como objectivo a identificação dos diferentes analitos, com consequente determinação do seu tempo de retenção, confirmação do respectivo espectro de massa e posterior comparação do mesmo com a base de dados do equipamento.

Os resultados obtidos permitiram identificar quase todos os analitos, com excepção da MDMA, do LSD e da buprenorfina não derivatizada, com *match* dos respectivos espectros de massa superior a 85%, quando comparados com a base de dados utilizada.

Com a injeção dos compostos não derivatizados, foi observada uma sobreposição da GBL e do GHB (Figura 14), em termos de tempo de retenção, a qual, associada a uma semelhança nos respectivos espectros de massa obtidos, aponta para a ocorrência de lactonização do GHB durante o processo de injeção, impossibilitando a distinção dos dois compostos. O GHB-d₆ é detectado a um tempo de retenção diferente e, de acordo com o espectro de massa observado, também na forma de lactona (Figura 15).

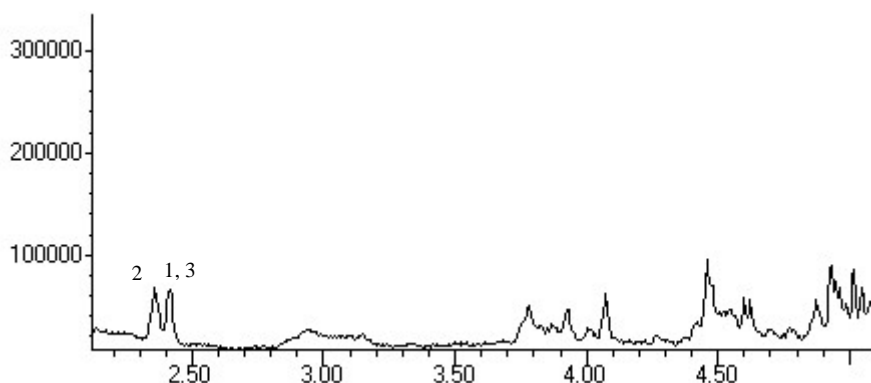


Figura 14 – Cromatograma, em SCAN, de mistura não derivatizada de GHB (1), GBL (3) e GHB-d₆ (2)

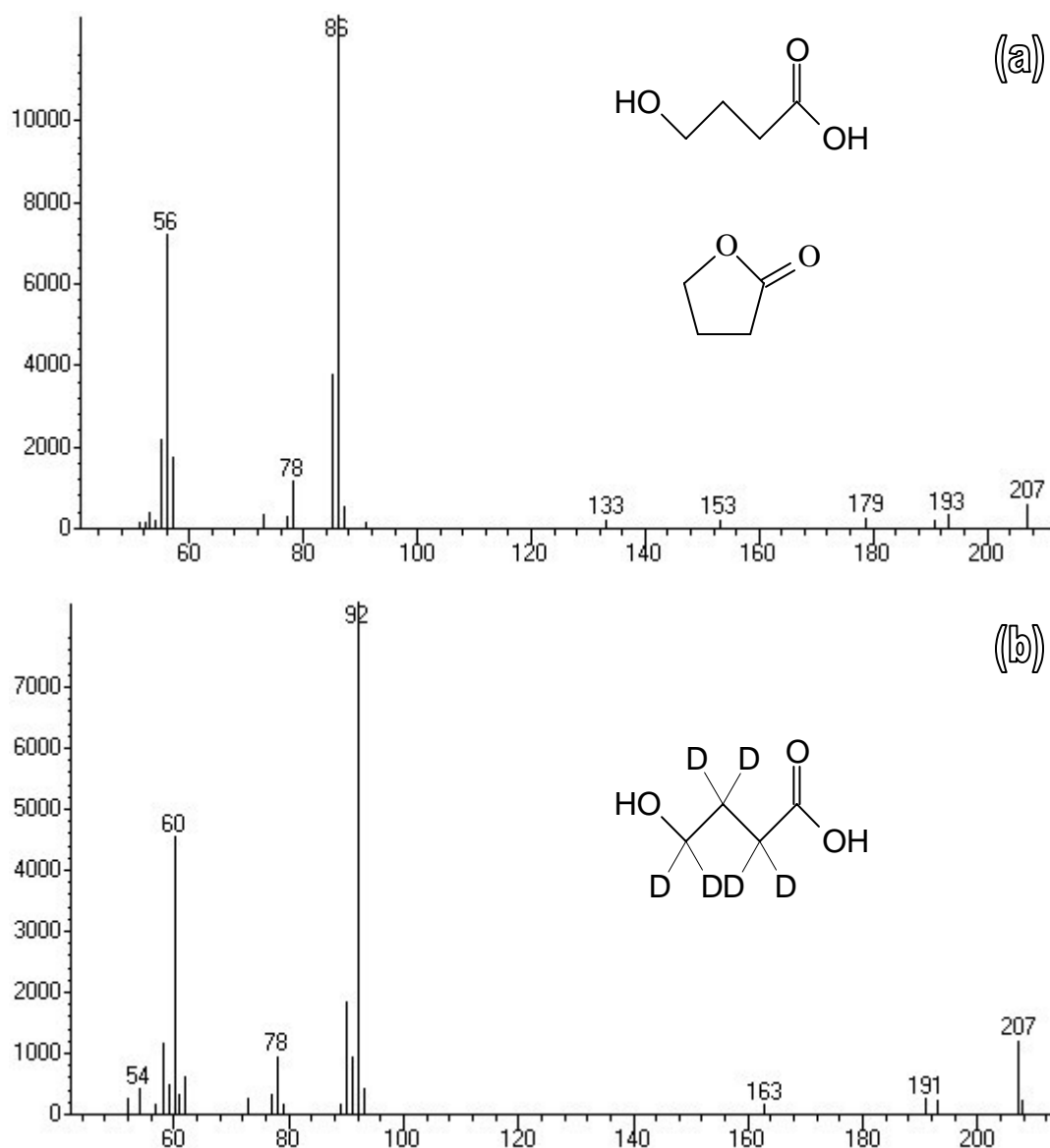


Figura 15 – Espectros de massa, em modo SCAN, dos picos correspondentes ao GHB e GBL não derivatizados (a) e ao GHB- d_6 não derivatizado (b)

Conhecendo as massas moleculares dos dois compostos (GHB: 104 *uma* e GBL: 86 *uma*), verifica-se que, no espectro de massa obtido, o pico associado ao valor de m/z 86, corresponde, no caso da GBL, ao valor da sua massa molecular e, no caso do GHB, à perda de 18 *uma*, correspondentes a uma molécula de água, comprovando a sua lactonização.

O procedimento de derivatização permitiu evitar a lactonização do GHB, permitindo a separação dos dois compostos. A Figura 16 apresenta o cromatograma obtido a partir de uma mistura de GHB, GBL e GHB- d_6 submetida a trimetilsilação prévia. Os espectros de massa do GHB-diTMS (Mr: 248) e do GHB- d_6 -diTMS (Mr: 254) são apresentados na Figura 17.

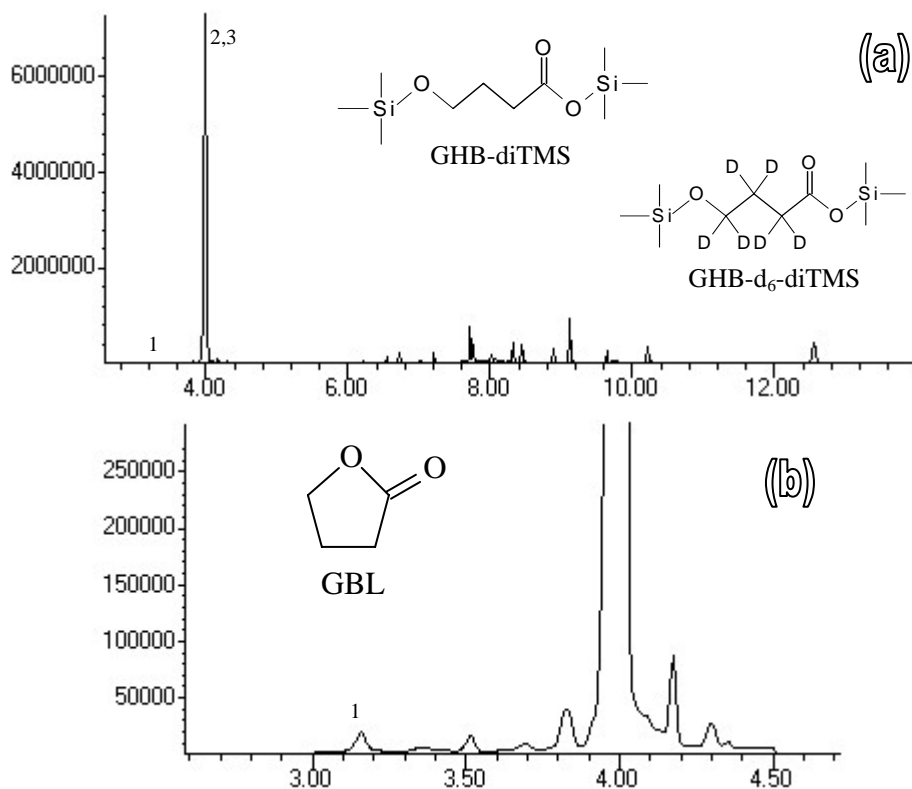


Figura 16 – (a) Cromatograma da mistura derivatizada de GBL (1), GHB-diTMS e GHB-d₆-diTMS (2,3) e (b) ampliação da figura 16 (a).

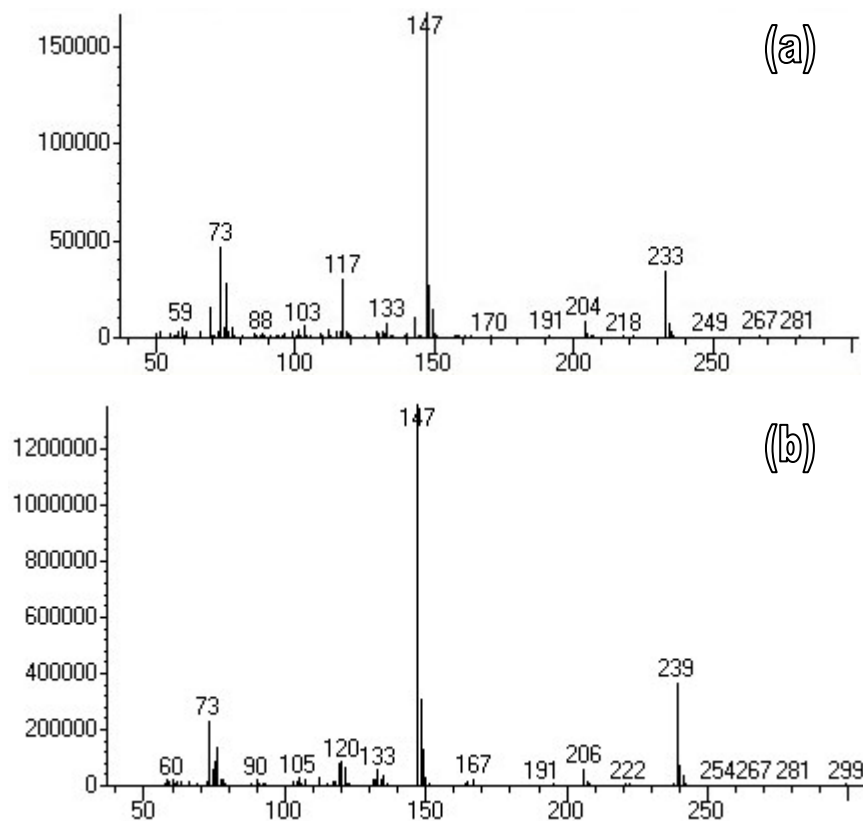


Figura 17 – Espectro de massa, em modo SCAN, do GHB-diTMS (a) e do GHB-d₆-diTMS (b)

De notar que, como seria de esperar, muito embora o GHB-diTMS e o análogo deuterado co-eluem neste procedimento, tal não levanta qualquer problema, já que a diferença de massa decorrente da deuteração permite uma diferenciação eficiente por detecção em modo SIM.

A detecção do propoxifeno revelou, como esperado,⁷⁰ e como referido em 2.7.4, algumas dificuldades. Assim, é de salientar a detecção de três picos associados ao analito (Figura 18).

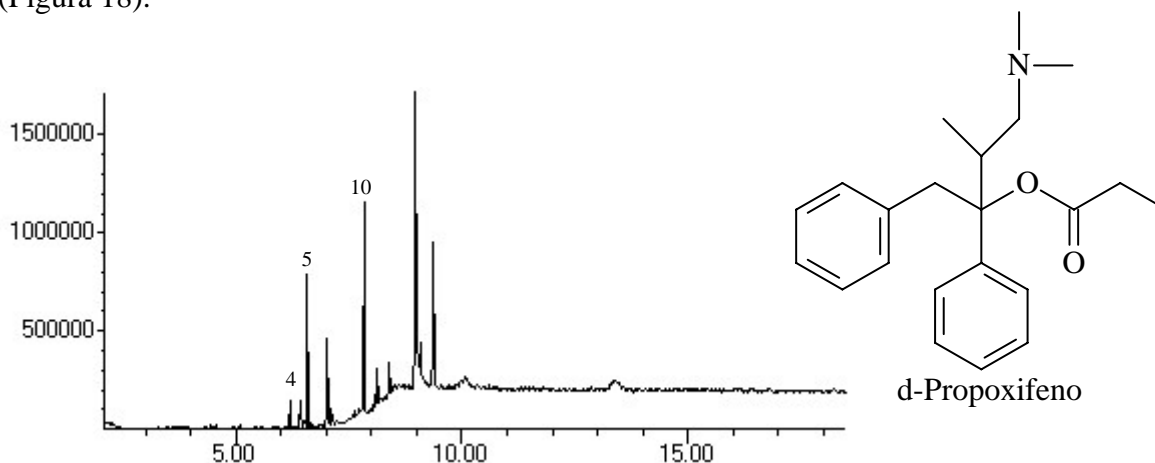
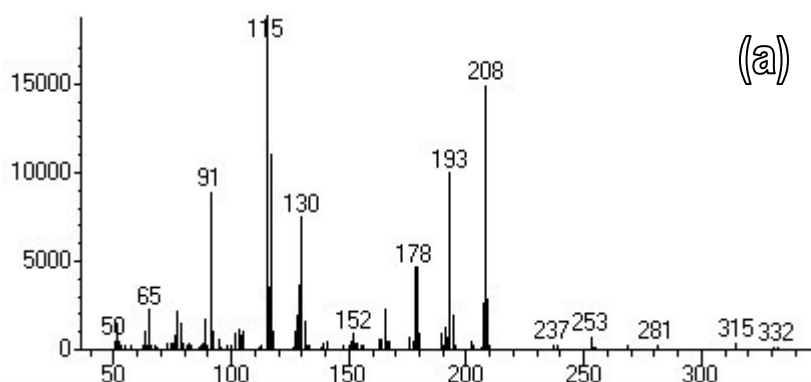


Figura 18 – Cromatograma, em modo SCAN, do d-propoxifeno (10), com identificação dos picos correspondentes aos seus produtos de degradação (4, 5)

Os dois primeiros picos corresponderão a produtos de degradação do composto (Figura 19 *a* e *b*), enquanto que o terceiro pico corresponde ao d-propoxifeno, o composto inicial (Figura 19 *c*).



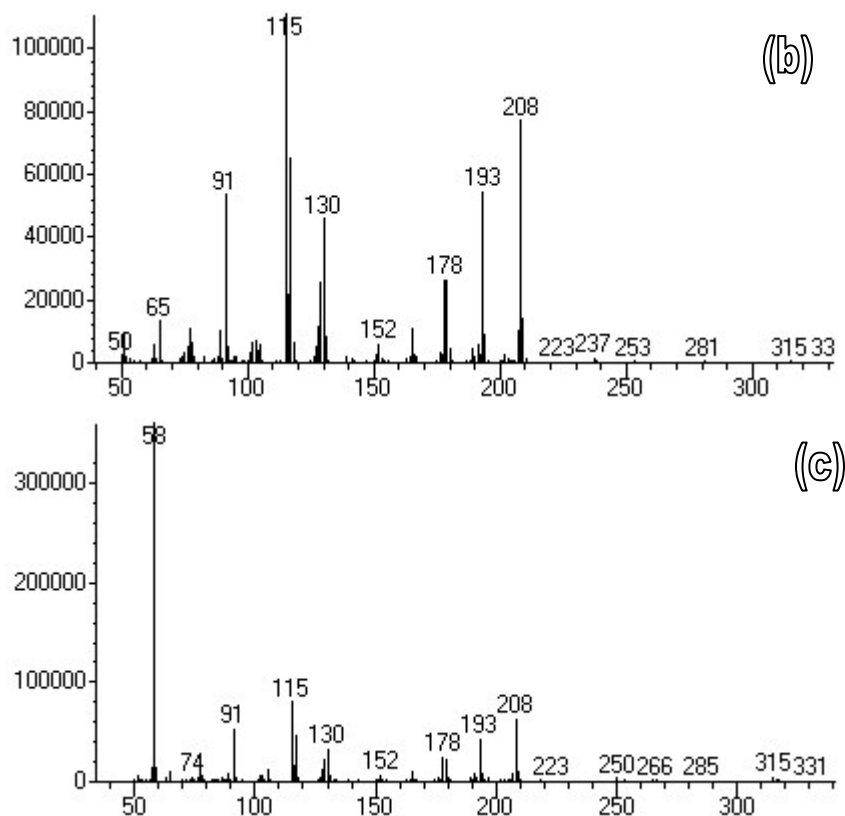


Figura 19 – Espectros de massa do produto de degradação 1 (a), do produto de degradação 2 (b) e do d-propoxifeno (c)

A obtenção dos três picos deve-se à decomposição térmica do composto no injetor, com a formação de dois produtos, por eliminação do ácido propiónico, conforme é sugerido por diversos autores.^{70,116} Os espectros obtidos para os dois produtos revelam a presença de um ião a m/z 208 como fragmento de massa mais elevada, que resultará da perda de um grupo $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2$, com transferência de hidreto. De referir que no espectro de massa do d-propoxifeno, o ião a m/z 208 é também o fragmento de massa mais elevado, o que sugere um mecanismo de fragmentação análogo, tendo como primeiro passo a eliminação de uma molécula de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$, seguido da perda do grupo $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2$.

Na tentativa de minimizar este problema, o d-propoxifeno foi injectado a dez temperaturas do injetor diferentes. Não se verificaram, no entanto, diferenças significativas nos resultados obtidos. Assim, acabou por ser adoptada a temperatura do injetor descrita no procedimento.

A buprenorfina foi detectada na forma de derivado trimetilsililado (Figura 20). O seu espectro contém o ião m/z 73, característico do reagente de derivatização, e um ião molecular ($m/z = 539$) com uma intensidade relativamente baixa.

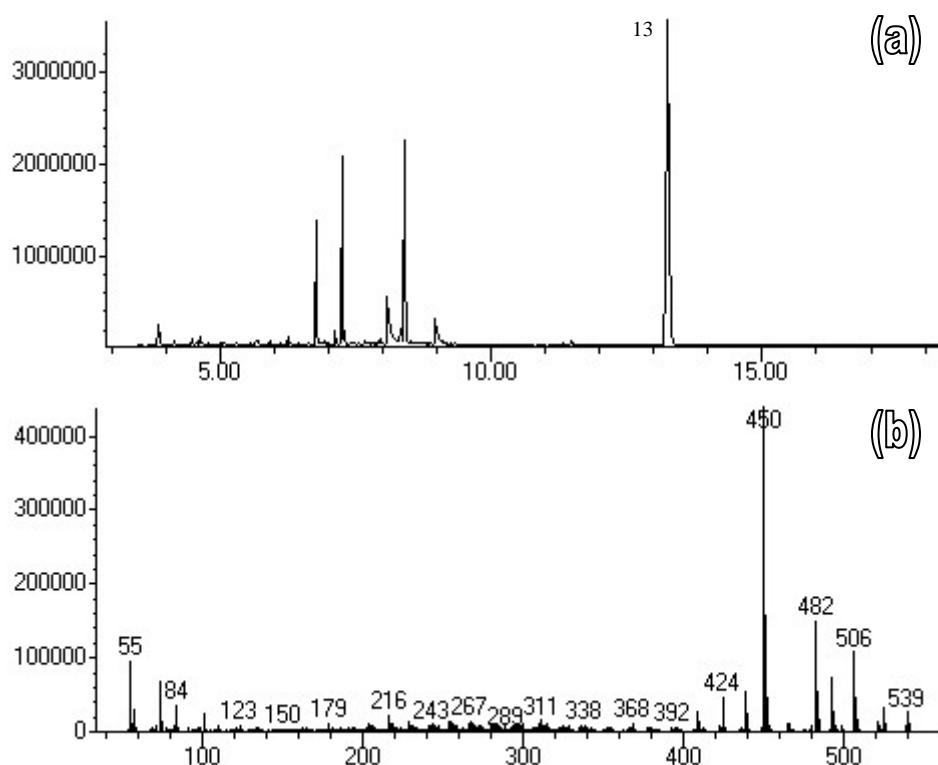


Figura 20 – Cromatograma (a) e espectro de massa, em modo SCAN (b), da buprenorfina-TMS (13)

A análise por GC-MS de soluções-padrão de MDMA não se mostrou uma hipótese passível de ser utilizada. A inexistência de qualquer sinal analítico correspondente a esta substância, com ou sem derivatização, tal como referido no capítulo 2.9.4, foi confirmada através da injeção em modo SCAN de soluções-padrão de MDMA em diversas concentrações, de 1 a 20 mg/L, muito superiores aos valores de referência para o *cut-off* (500 ng/mL), nas condições cromatográficas descritas.

A detecção eficiente de LSD, em concentrações que variaram entre 1 e 20 mg/L, também não foi conseguida. O único sinal analítico detectado, com intensidade muito baixa, corresponde a LSD livre, não tendo sido detectado qualquer sinal analítico de LSD derivatizado.

Os cromatogramas e respectivos espectros de massa de todos os compostos, obtidos em modo SCAN, são apresentados no Anexo 1.

Após a análise dos padrões analíticos dos compostos estudados, a adoção de um procedimento de derivatização por sililação justificou-se para a buprenorfina e o GHB, neste último caso para garantir a sua diferenciação da GBL.

5.1.2. Modo de Detecção SIM

A escolha dos iões para o modo SIM teve em consideração os espectros de massa obtidos em modo SCAN, tendo sido escolhidos, pelo menos, os três iões mais intensos de cada analito e que não apresentem, paralelamente, interferências significativas por parte da matriz, favorecendo, desse modo, a sua identificação inequívoca. As três exceções envolvem o GHB, a GBL e o GHB-d₆, por diferentes razões: para a GBL, apenas foram escolhidos os dois iões que apresentam sinais suficientemente intensos para serem perfeitamente separados de qualquer interferência; para o GHB-diTMS (iões $m/z = 117$ e $m/z = 233$) e para o GHB-d₆-diTMS (iões $m/z = 120$ e $m/z = 239$), o terceiro ião com possibilidade de ser escolhido ($m/z = 147$) é comum aos dois compostos, não permitindo, dada a sua co-eluição, a sua quantificação independente.

Na escolha dos iões da PCP ressalta a inclusão de dois iões com diferença de massas de uma unidade (242, 243). Esta escolha justifica-se pelo facto de se encontrar provado que são iões resultantes de diferentes vias de fragmentação da molécula, conforme se comprova facilmente pelo comportamento da PCP – d₅, a qual apresenta uma diferença de duas unidades de massa nos dois iões correspondentes (246, 248).⁶⁰

Os iões escolhidos para a análise cromatográfica em modo SIM encontram-se representados na Tabela 8. Os cromatogramas obtidos em modo SIM para cada composto são apresentados no Anexo 2.

Tabela 8 – Tempos de retenção e iões escolhidos para determinação e quantificação em modo SIM

Substância	Tempo de Retenção (min)	Iões escolhidos para SIM (m/z)
GBL (1)	3,10	86, 56
GHB – d₆ – diTMS (2)	3,98	120, 239
GHB – diTMS (3)	4,01	117, 233
Produto de degradação do propoxifeno 1 (4)	6,20	91, 115, 193, 208
Produto de degradação do propoxifeno 2 (5)	6,54	91, 115, 193, 208
PCP (6)	7,05	91, 200, 242, 243
PCP-d₅ (7)	7,05	96, 205, 246, 248
Cetamina (8)	7,21	180, 182, 209
d – Propoxifeno (9)	7,76	58, 91, 115, 193, 208
Metadona (10)	7,77	72, 294, 309
Flunitrazepam (11)	9,78	238, 266, 285, 286, 312, 313
7-aminoflunitrazepam (12)	10,36	254, 255, 282, 283
Buprenorfina-TMS (13)	12,54	450, 451, 482, 506

Pela observação da Tabela 8, e analisando os tempos de retenção obtidos, destacam-se três situações de sobreposição cromatográfica de analitos (representadas a negrito), mas, em qualquer um dos casos, os iões seleccionados para análise em modo SIM são diferentes, permitindo uma identificação inequívoca de todos os compostos. Nas figuras seguintes, são apresentados cromatogramas com todos os compostos determinados e assinalados. No cromatograma representado na Figura 21, no pico n.º “2,3” co-eluem o GHB e o GHB-d₆ derivatizados.

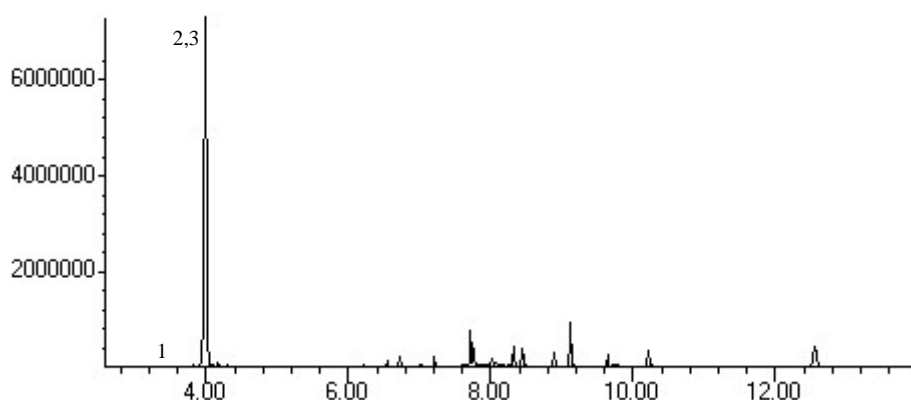


Figura 21 – Cromatograma de GC-MS em modo SIM da mistura contendo todos os compostos determinados em modo SIM: GBL (1), GHB e GHB-d₆ derivatizados (2, 3)

No cromatograma representado na Figura 22, no pico n.º “6,7” co-eluem a PCP e a PCP-d₅. Os picos 9 e 10 correspondem à metadona e ao d-propoxifeno, respectivamente. Neste último caso, a resolução cromatográfica dos dois picos não é total. No entanto, como referido acima, qualquer um dos compostos referidos apresenta diferentes iões de caracterização/quantificação, o que permitirá a sua identificação e quantificação inequívocas.

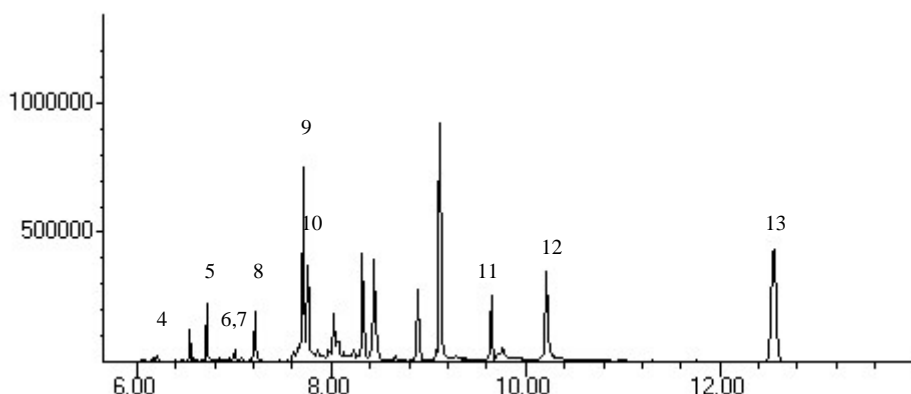


Figura 22 – Expansão do Cromatograma da Figura 21: propoxifeno (4, 5, 10); PCP e PCP-d₅ (6, 7); cetamina (8); metadona (9); flunitrazepam (11); 7-aminoflunitrazepam (12); buprenorfina-TMS (13)

5.2. Especificidade / Selectividade

A especificidade e a selectividade salientam a capacidade que o método apresenta em discriminar e identificar o composto estudado relativamente a substâncias que possam eventualmente estar presentes na matriz, nomeadamente metabolitos, isómeros, produtos de degradação da coluna e dos materiais utilizados na preparação da amostra, componentes endógenos, entre outros.²

Para tal, faz-se uma comparação entre os resultados obtidos na análise de matrizes complexas, onde se encontram os analitos a determinar, e a análise de amostras brancas das mesmas matrizes, tendo como objectivo a identificação de eventuais sinais interferentes que, de algum modo, condicionem os resultados obtidos nas amostras fortificadas.²

A comparação dos cromatogramas obtidos na injeção de uma solução – padrão dos compostos analisados (Figura 21 e Figura 22) e de um branco apenas com reagente de derivatização (Figura 23), permite concluir que não há picos interferentes no cromatograma com origem no referido reagente.

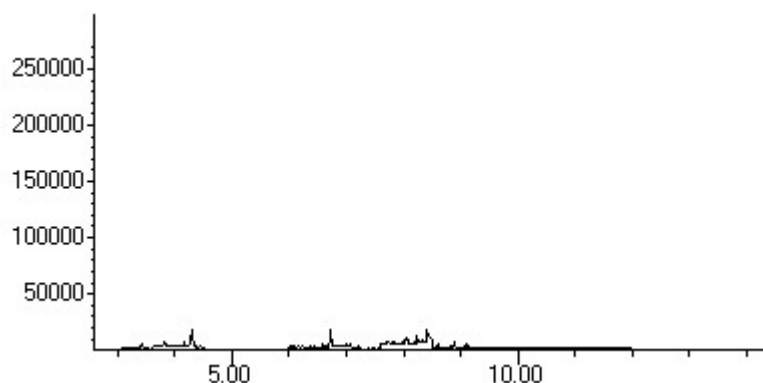


Figura 23 – Cromatograma referente ao reagente de derivatização (BSTFA + TMCS 99:1)

É possível também verificar (Figura 24) através da injeção de uma amostra de sangue isenta de analitos, tratada e preparada através do procedimento desenvolvido, que não se observa qualquer sinal cromatográfico susceptível de causar interferências ao longo do cromatograma, com excepção dos sinais verificados entre os tempos 7,6 e 8,5. Estes sinais são justificados pela escolha dos iões 72 e 91 m/z , associados respectivamente à metadona e ao propoxifeno, os quais, pelo baixo valor das massas dos fragmentos considerados, são mais susceptíveis a interferências de matriz. No entanto, os resultados

obtidos permitiram garantir a identificação dos dois compostos, quer através dos seus tempos de retenção (7,76 min. e 7,77 min., respectivamente), onde se nota um nível mais baixo de interferência da matriz, quer através dos respectivos espectros de massa. Avaliando a metadona, a intensidade do ião m/z 72, comparativamente com todos os outros iões do grupo, é um indício específico da sua presença na amostra. No caso do d-propoxifeno, a elevada intensidade do ião m/z 58, comparativamente com todos os outros iões do grupo, associada à presença dos dois picos correspondentes aos produtos de degradação térmica são, também, indicadores fiáveis para a confirmação da sua presença.

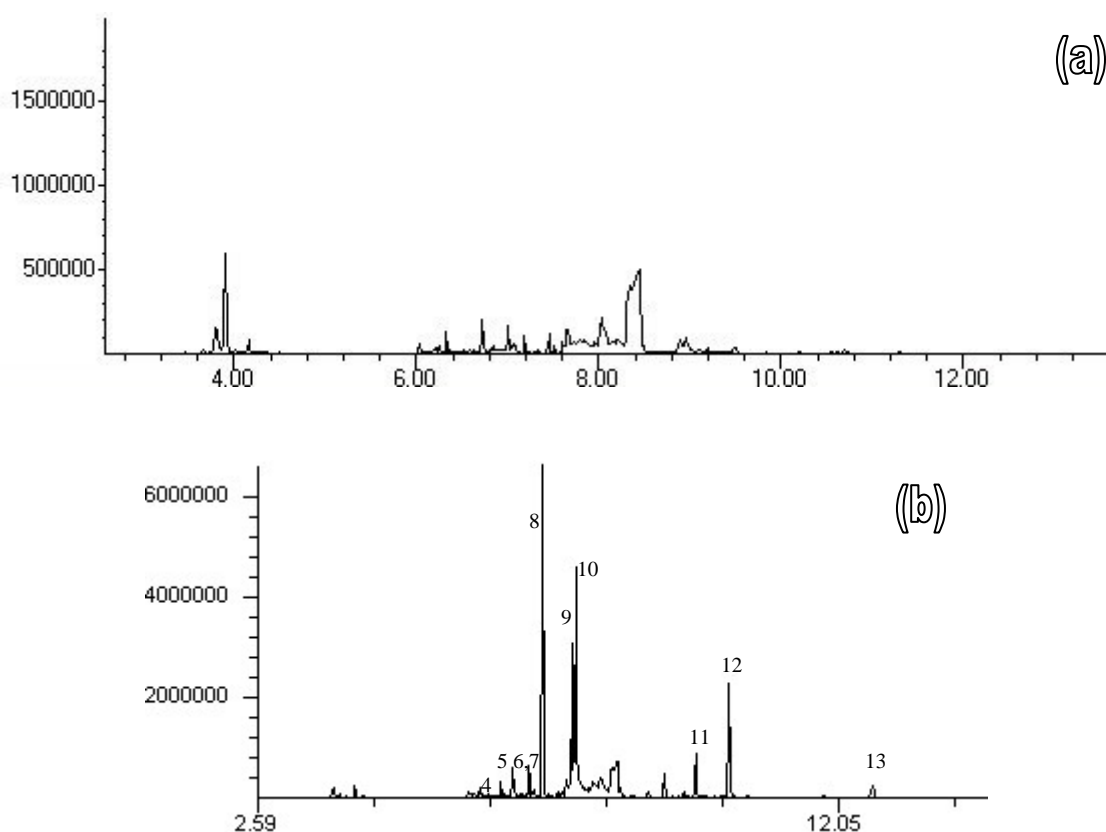


Figura 24 – Cromatograma, em SIM, de um branco de sangue (a) e de uma amostra de sangue fortificada com uma mistura de analitos: produtos de degradação do propoxifeno (4,5), PCP e PCP-d₅ (6, 7), cetamina (8), metadona (9), propoxifeno (10), flunitrazepam (11), 7-aminoflunitrazepam (12) e buprenorfina (13) (b)

Os cromatogramas resultantes da injeção de um branco de urina e de uma urina fortificada, após extração por SPE e derivatização, são apresentados na Figura 25. Avaliando estes resultados, verifica-se, também neste caso, a ausência de sinais interferentes, permitindo uma identificação inequívoca dos analitos estudados, com as mesmas premissas verificadas nas amostras de sangue total.

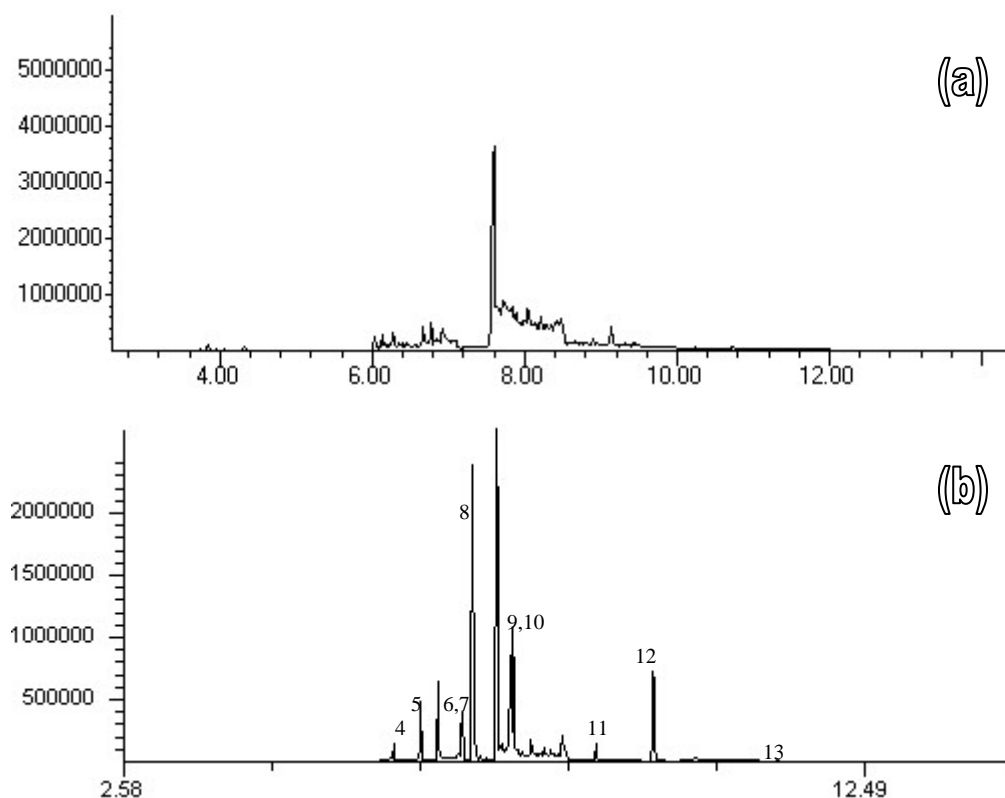


Figura 25 – Cromatograma, em modo SIM, de um branco de urina (a) e de uma amostra de urina fortificada com uma mistura dos analitos: produtos de degradação do propoxifeno (4,5), PCP e PCP-d₅ (6, 7), cetamina (8), metadona (9), propoxifeno (10), flunitrazepam (11), 7-aminoflunitrazepam (12) e buprenorfina (13) (b)

Concluindo, pode afirmar-se que este método pode ser considerado específico e selectivo para os analitos a determinar.

5.3. Curvas de Calibração

Para a preparação das curvas de calibração foram considerados valores de referência que permitissem, quando possível, abranger a detecção e quantificação dos compostos estudados desde níveis terapêuticos até níveis letais (Tabela 9).^{22,102,117}

Tabela 9 – Gamas terapêuticas e tóxicas dos compostos estudados

Substância	Gama Terapêutica	Valores Tóxicos
GBL	-	-
GHB	50-120 mg/L	> 100 mg/L
Propoxifeno	50-750 ng/mL	> 1000 ng/mL
PCP (Fenciclidina)	25 ng/mL de cut-off	> 25 ng/mL
Metadona	50 – 750 ng/mL	1000 ng/mL
Cetamina	0,5 – 6,5 mg/L	7 mg/L
7 - Aminoflunitrazepam	-	-
Flunitrazepam	5 – 15 ng/mL	50 ng/mL
Buprenorfina	1 – 10 ng/mL	> 200 ng/mL

Para a obtenção das curvas de calibração foi utilizado o método de regressão linear pelos mínimos quadrados.^{2,113}

Para cada substância foram preparados cinco níveis de concentração e um branco com a presença, apenas, dos padrões internos, conforme sugerido pela literatura.^{2,113} Foram seleccionadas curvas que permitissem uma distinção clara entre os valores tóxicos e terapêuticos para cada composto. Cada nível de concentração foi injectado em triplicado.

As gamas de trabalho, os valores de declive e ordenada na origem associados às rectas obtidas para cada substância e os respectivos coeficientes de correlação encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Gamas de concentração e valores de caracterização das curvas de calibração obtidas

Substância	Gama de Concentrações	m	b	r ²
GBL (mg/L)	0, 1, 2, 5, 10, 15	0,0020	0,0001	0,995
GHB (mg/L)	0, 1, 2, 5, 10, 15	0,1686	0,0111	0,999
PCP (ng/mL)	10, 15, 25, 50, 100	0,0048	0,0142	0,993
Metadona (ng/mL) IQ 72	0, 100, 250, 500, 1000, 1500	0,2413	4,7698	0,940
Metadona (ng/mL) IQ 294	0, 100, 250, 500, 1000, 1500	0,0002	-0,0204	0,992
Propoxifeno (ng/mL)	250, 500, 1000, 1500, 2000	0,0023	0,0582	0,992
Cetamina (ng/mL)	250, 500, 1000, 2000, 3000	0,0039	-0,8151	0,994
Flunitrazepam (ng/mL)	10,2 – 20,4 – 51 – 71,4 – 102	0,0012	-0,0105	0,994
7-Aminoflunitrazepam (ng/mL)	11, 22, 55, 77, 110	0,0008	0,0114	0,998
Buprenorfina (ng/mL)	0, 10, 50, 100, 250, 500	0,0676	-0,8461	0,995

Das curvas obtidas inicialmente, apenas a metadona apresentou um coeficiente de correlação (r²) abaixo de 0,990, o valor de referência previamente definido.^{2,113} Este resultado poderá ser justificado pela utilização de um fragmento de massa baixa (*m/z* 72) como ião de quantificação (IQ) em SIM, passível de alguma interferência. Para ultrapassar esta dificuldade, foi escolhido para ião de quantificação o ião *m/z* 294, minimizando assim esta influência e melhorando os valores de caracterização da curva de calibração, obtendo-se assim um valor de coeficiente de correlação aceitável.

A curva de calibração associada ao propoxifeno, utilizando o pico associado ao seu composto original, apresentava valores muito baixos de correlação, devido à sua degradação durante a injeção, conforme referido nos capítulos anteriores, tendo assim sido rejeitada. Assim, na tentativa de se ultrapassar esta limitação, os dados de calibração apresentados resultam da utilização do somatório das áreas cromatograficas do pico do composto e dos dois produtos de degradação.

As curvas apresentam, então, um bom ajuste aos pontos experimentais, ficando a qualidade dos resultados dependente apenas da linearidade, cujos resultados serão apresentados adiante.

5.4. Linearidade e Gama de Trabalho

A linearidade de uma curva de calibração vem comprovar a possibilidade de utilização da mesma ao longo de toda a sua extensão, permitindo, paralelamente, definir a gama de trabalho do método para cada composto estudado.

A avaliação da linearidade é efectuada utilizando um teste de homogeneidade de variâncias (teste F), verificando a possível existência de diferenças significativas entre os valores de variância nos limites da gama de trabalho. Para tal, foram preparadas dez alíquotas de cada composto em duas concentrações diferentes, correspondentes ao primeiro e último níveis da gama de trabalho prevista.^{2,113}

Os valores de variância obtidos são utilizados para calcular um valor de F (F_{calc}), o qual será comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fischer a 95% (F_{crit}).^{2,113}

Se $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$, então as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho demonstra estar bem ajustada.^{2,113}

Se $F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$, então as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deverá ser encurtada até se obter o resultado contrário.^{2,113}

Tabela 11 – Valores obtidos nos testes de linearidade

Composto	S_1^2	S_2^2	F_{calc}	F_{crit} (95%)	Gama de Trabalho
GHB	0,018	0,045	2,482	4,026	1 - 15 mg/L
GBL	0,194	0,404	2,083		1 - 15 mg/L
PCP	5,284	18,993	3,595		15 - 100 ng/mL
Cetamina	6577,0714	17809,94	2,707		250 – 3000 ng/mL
Metadona	12830,469	39816,588	3,103		100 – 1500 ng/mL
Propoxifeno	16602,068	56585,118	3,408		250 – 2000 ng/mL
Flunitrazepam	2333,1341	3254,1192	1,394		15,3 – 102 ng/mL
7-Aminoflunitrazepam	97840,679	210716,65	2,154		16,5 – 110 ng/mL
Buprenorfina	79,6639	256,4169	3,218		50 – 500 ng/mL

Os resultados obtidos nos testes de linearidade efectuados, apresentados na Tabela 11, demonstram que as curvas de calibração apresentam um comportamento linear ao longo de toda a gama de trabalho definida para cada analito.

5.5. *Limiares Analíticos*

O Limite de Detecção (Ld) pode ser definido como o valor mínimo a partir do qual é possível detectar o analito com uma certeza estatística definida (normalmente 95%).^{2,113}

O Limite de Quantificação (Lq) refere-se ao menor valor de concentração medido a partir do qual é possível uma quantificação do analito, com uma determinada precisão e exactidão.^{2,113}

Para este trabalho, estes valores foram definidos pelas seguintes equações:

$$Ld = (3,3 \times S_{y/x}) / b \quad Lq = (10 \times S_{y/x}) / b$$

Em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da curva de calibração (sensibilidade).^{2,113}

Os Limites de Detecção (Ld) e de Quantificação (Lq) para cada substância encontram-se descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Limites de detecção e de quantificação dos analitos estudados

Substância	Ld	Lq
GBL (mg/L)	1,24	3,76
GHB (mg/L)	0,65	1,96
Propoxifeno (ng/mL)	189,21	573,38
PCP (ng/mL)	4,73	14,32
Metadona (ng/mL)	173,64	526,17
Cetamina (ng/mL)	274,01	830,35
Flunitrazepam (ng/mL)	7,30	22,14
7-Aminoflunitrazepam (ng/mL)	6,80	20,61
Buprenorfina (ng/mL)	47,97	145,38

Os Limites de Detecção e Limites de Quantificação obtidos coadunam-se com os valores terapêuticos considerados para todos os compostos estudados (Tabela 9), com excepção da buprenorfina, já que o Ld calculado se apresenta superior ao limite máximo referenciado para valores terapêuticos desta substância. Esta questão será abordada no capítulo 6.

5.6. Avaliação da Qualidade dos Resultados

Para a correcta validação de um método, é necessária a verificação das suas condições de repetibilidade. Esta está associada à precisão obtida em condições mantidas semelhantes (mesmo laboratório, mesmo operador e equipamento, num curto intervalo de tempo).^{2,112,113} Para este trabalho, foram preparados três níveis de concentração (concentração inferior, média e superior da gama de trabalho) por substância, com dez ensaios para cada nível, tendo sido calculados a concentração média obtida ([média obtida]), o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação para cada nível (CV, em %). Os resultados são apresentados na Tabela 13:

Tabela 13 – Valores obtidos nos testes de repetibilidade

Composto	[Padrão]	[média obtida]	σ	CV (%)
GBL (mg/L)	1	1,2217	0,2538	15
	5	5,4846	0,5664	10
	10	9,635	0,627	7
GHB (mg/L)	1	1,0235	0,0209	2
	5	5,0385	0,0172	0,3
	15	13,9669	0,3619	3
PCP (ng/mL)	15	17,49	0,62	4
	50	68,46	1,86	3
	100	128,17	4,41	3
Metadona (ng/mL)	100	157,59	21,59	14
	500	635,18	56,18	9
	1500	1741,84	93,28	5
Propoxifeno (ng/mL)	250	262,11	25,546	10
	1000	1141,79	73,571	6
	2000	1727,98	69,022	5
Cetamina (ng/mL)	250	299,81	2,94	1
	1000	608,85	33,12	5
	3000	1745,63	155,88	9
Flunitrazepam (ng/mL)	10,2	12,24	0,75	6
	51	44,83	3,55	8
	102	122,86	7,07	6
7-Aminoflunitrazepam (ng/mL)	16,5	27,05	5,33	14
	55	37,06	5,76	15
	110	158,54	17,36	11
Buprenorfina (ng/mL)	25	15,94	0,02	0,1
	100	90,69	9,40	10
	500	347,69	35,17	10

Todos os compostos apresentaram coeficientes de variação iguais ou inferiores a 15%, valor considerado de referência para GC-MS², avaliando a reprodutibilidade do método.

5.7. Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação permitem estudar o rendimento de extracção, um outro parâmetro importante, já que avalia a eficiência do método de tratamento e preparação da amostra.¹¹²

O rendimento de extracção foi calculado através de uma comparação directa do quociente das áreas dos picos correspondentes ao analito e ao padrão interno (PI) obtidas a partir de amostras fortificadas antes da extracção, com a razão das áreas dos picos do mesmo analito adicionado após a extracção e do padrão interno, adicionado antes da mesma, conforme representado no capítulo 4.7.¹¹⁴

Os resultados obtidos, em termos de rendimento de extracção, são descritos na Tabela 14.

Tabela 14 – Rendimento de extracção dos analitos estudados, em amostras de urina e sangue total

Composto	Concentração	Valores de Recuperação (%)	
		Urina	Sangue
GHB	1 – 5 – 15 (mg/L)	/	/
GBL	1 – 5 – 15 (mg/L)	/	/
PCP	15 – 50 – 100 (ng/mL)	68	102
Cetamina	250 – 1000 – 2000 (ng/mL)	87	81
Metadona	100 – 500 – 1500 (ng/mL)	94	68
Propoxifeno	250 – 1000 – 2000 (ng/mL)	97	77
Flunitrazepam	15,3 – 51 – 102 (ng/mL)	41	84
7 – Aminoflunitrazepam	11 – 55 – 110 (ng/mL)	90	79
Buprenorfina	50 – 100 – 500 (ng/mL)	80	87

O rendimento obtido para a PCP é aceitável para a urina, coadunando-se com o valor internacionalmente definido como *cut-off* para o analito na amostra referida (25 ng/mL) e integrando-o na gama de trabalho estudada. Em termos de sangue total, o comportamento da PCP foi ainda melhor, com uma capacidade de recuperação de 102%. Deste modo, fica garantida a detecção e quantificação da PCP ainda abaixo do valor de *cut-off* instituído.

Analisando os resultados obtidos para a cetamina, os valores de recuperação para urina e sangue total situaram-se na gama dos 80%. Considerando os níveis terapêuticos de

referência (> 500 ng/mL), garante-se a detecção da substância desde níveis “sub-terapêuticos e residuais.

A metadona apresentou valores de recuperação diferentes para o sangue e urina, mas garantindo, em ambos, uma gama de trabalho iniciada em níveis terapêuticos.

Para o flunitrazepam, os valores obtidos permitem abranger com segurança os valores tóxicos, não sendo, no entanto, tão fiável ao nível da gama terapêutica. O seu metabolito (7-aminoflunitrazepam), em contrapartida, permitiu a sua quantificação em valores terapêuticos, com valores de recuperação situados na gama dos 90% na urina e 79% no sangue, apresentando uma gama de trabalho mais alargada.

A buprenorfina apresenta uma boa capacidade de recuperação em qualquer dos níveis testados, permitindo a quantificação a nível tóxico. Este procedimento permite cobrir, também, toda uma “zona cinzenta” que separa os valores de referência para níveis terapêuticos e os valores letais, sendo, no entanto, limitado na detecção do analito em valores terapêuticos.

O propoxifeno apresenta valores de recuperação bastante aceitáveis, com 97% de capacidade de recuperação na urina e 77% em sangue total, o que permite aplicar este método a partir de valores terapêuticos.

Dos compostos analisados, não foi detectado qualquer sinal da GBL, do GHB e do GHB- d_6 , sugerindo a perda total dos analitos ao longo do procedimento extractivo.

6. Conclusões

A toxicologia forense *post-mortem* traz desafios constantes, quer em termos analíticos, quer em termos de interpretação e validação de resultados. Assim, os resultados toxicológicos nunca deverão ser interpretados de forma independente mas sim com toda a informação associada ao caso, quer pré-autóptica, quer com a avaliação de todos os resultados provenientes das diferentes áreas das Ciências Forenses consultadas.^{88,102,118}

Paralelamente, a avaliação em termos clínicos ganha também um novo fulgor, com a necessidade de se comprovar o estado de influenciado por determinada substância, quer em termos penais, quer em termos de outras áreas do Direito.¹

Como foi atrás referido, o desenvolvimento de metodologias analíticas sistemáticas tornou-se a ferramenta mais vulgar dos Serviços de Toxicologia Forense. Todavia, não existe nada comparável a um procedimento extractivo com resultados óptimos, sem perdas de analito, para todos os diferentes tipos de amostras que possam vir a ser estudados.¹⁰¹ Desse modo, não é objectivo deste trabalho resolver “todos” os problemas e dificuldades deste tipo de metodologia analítica, mas sim estruturar um procedimento analítico eficaz para os fins em vista no laboratório forense onde será aplicado.

O método desenvolvido apresenta vantagens ao nível da metodologia que deverão ser salientadas. Uma vantagem engloba a possibilidade de automatização do procedimento de SPE, que é um factor não negligenciável. De facto, a possibilidade de serem utilizados extractores automatizados, com a programação dos passos de preparação da amostra, sem a necessidade de grande manipulação manual da mesma, traz melhorias ao nível da reprodutibilidade de extracção e da garantia de qualidade do resultado, minimizando eventuais erros do operador. Outra vantagem engloba o facto de não ser necessária a utilização de soluções-tampão e outras soluções de preparação mais morosa e precisa, baseando-se todo o procedimento na utilização de solventes orgânicos e respectivas misturas facilmente disponibilizados em qualquer laboratório, com uma abrangência de utilização generalista.

A adequação do procedimento a amostras reais permite a sua aplicação aos objectivos previstos, garantindo, mais uma vez, que os resultados obtidos com a sua aplicação têm, efectivamente, utilidade para o estudo do caso, quer a nível clínico, quer ao nível da toxicologia *post-mortem*. No procedimento estudado, verifica-se a sua boa

adequação às concentrações esperadas em amostras reais, tendo por base os valores de referência (Tabela 9). De facto, dos analitos testados, fica comprovada a detecção e quantificação em valores tóxicos da PCP, metadona, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, propoxifeno, cetamina e buprenorfina. Ao nível dos valores terapêuticos, verifica-se de novo a possibilidade de detecção e quantificação da PCP, metadona, 7-Aminoflunitrazepam, cetamina e propoxifeno.

O Flunitrazepam apresenta um limite de quantificação ligeiramente superior às concentrações terapêuticas de referência, ficando, mesmo assim, bastante abaixo do limite mínimo da gama tóxica de concentração, permitindo a adopção do procedimento para a quantificação de concentrações tóxicas.

A buprenorfina apresenta, também, resultados semelhantes, com os limites de detecção e quantificação ligeiramente superiores à gama terapêutica, mas bastante abaixo do valor mínimo considerado para a gama tóxica. Em qualquer um dos casos, a sua determinação e quantificação dentro desta “área cinzenta” da gama, entre os limites encontrados para a gama terapêutica e para a gama tóxica não deixa de ser fundamental, até para que a interpretação final do caso seja ainda mais esclarecedora, quer da causa de morte, quer sobre o estado de influenciado (a nível clínico) incluindo eventuais interações metabólicas com outros analitos também presentes.⁹³

A literatura consultada com referências a intoxicações por cetamina apresenta valores letais entre 1,6 e 6,9 mg/L, ultrapassando, até, o limite superior da gama de concentrações estudada.⁵³ Os valores de recuperação obtidos são, também superiores aos descritos na literatura para outras metodologias.^{54,58} Paralelamente, a gama de determinação e quantificação da cetamina validada traz uma vantagem suplementar, já que envolve valores abaixo da gama terapêutica. Assim, a possibilidade de determinação de valores “sub-terapêuticos”, em termos de concentrações do analito, permitirá a obtenção de resultados positivos mesmo após um intervalo de tempo entre o consumo da substância e a recolha da amostra mais longo (janela de tempo da sua detecção), contribuindo, assim, de uma forma mais útil para a resolução de casos de suspeita de abuso sexual, onde esse mesmo intervalo de tempo entre o consumo da substância, o acto criminoso e a avaliação médico-legal, com a respectiva colheita de amostras, é um factor limitante e fundamental.

A detecção e a quantificação do propoxifeno apresentaram dificuldades associadas à sua degradação térmica. A curva de calibração obtida, que utilizou a soma das áreas dos

picos associados aos três compostos resultantes, permitiu ultrapassar essas dificuldades, apresentando parâmetros de validação que permitem a adopção desta metodologia. A elevada temperatura de injeção, associada à elevada temperatura da fonte de ionização coadunam-se com a degradação obtida. Gaillard e colaboradores referem o surgimento de dois produtos de degradação a partir dos 200°C, temperatura inferior à do injector (300°C) e da fonte de ionização (230°C).⁷⁰ As elevadas temperaturas associadas a este processo cromatográfico em particular poderão também originar alguma degradação do composto dentro da própria coluna, originando algum ruído, “tailing” dos picos e mesmo alguma irreprodutibilidade na correlação das áreas dos três picos obtidos. No entanto, os resultados obtidos em termos de parâmetros de validação analítica permitem a aceitação da curva de calibração criada e do método proposto para a determinação deste composto em particular.

A ausência de sinais analíticos correspondentes ao GHB e à GBL nos cromatogramas das amostras fortificadas poderá ser justificada pelo procedimento de extracção. De facto, o passo de lavagem da coluna, com a adição de água, HCl 0,1 M e 5% de CH₃OH em H₂O pode ser associado ao passo referido por Wood *et al*³⁷ que, utilizando colunas semelhantes, sugere a utilização de ácido fórmico 0,1 M no passo de eluição do GHB. Assim, o GHB e a GBL poderão estar a eluir no passo de lavagem da coluna de SPE. Essa saída extemporânea pode ser justificada pela elevada solubilidade do GHB e da GBL em água²².

Os resultados obtidos e a sua interpretação colocam novas questões e possibilidades de trabalho futuro. Nesse sentido, a detecção e quantificação do GHB e da GBL implicará o desenvolvimento de metodologia específica. Uma alternativa envolverá a eliminação do passo de lavagem do procedimento adoptado, passando directamente para o passo de eluição da amostra.

Para a quantificação do propoxifeno, o seu comportamento cromatográfico poderá ser investigado. O estudo mais aprofundado das temperaturas a utilizar para o injector e para a fonte de ionização, com valores mais próximos dos 200°C, será uma hipótese de estudo futuro. Ressalve-se, também, a possibilidade de se aprofundar o estudo dos três compostos obtidos, sugerindo-se a utilização de GC-MS com ionização química para uma correcta identificação e caracterização dos mesmos.

Uma alternativa para a purificação e concentração da amostra pode passar pela Microextracção em Fase Sólida (SPME), com ou sem derivatização, referida em alguma

literatura consultada e que poderá ultrapassar, ou minimizar, algumas das dificuldades e limitações de separação e isolamento dos analitos estudados, podendo ser possível englobar, num mesmo procedimento, os dois compostos não detectados (GHB e GBL).^{15,119}

A utilização de uma técnica analítica alternativa, como LC-MS, é uma outra possibilidade de abordagem, sugerida por diversos autores em algumas das referências consultadas, citadas no capítulo associado à determinação analítica de todos os compostos.

A continuação do desenvolvimento desta metodologia passará, finalmente, pela adição de novos compostos que, entretanto, surjam associados à cultura *rave*, através da inserção nos seus circuitos de consumo, e da adição e definição de metabolitos de alguns dos compostos já determinados, ainda não incluídos (norcetamina, EDDP, norbuprenorfina, norpropoxifeno, os metabolitos da PCP e LSD,...). Tal desiderato permitirá aumentar a abrangência de compostos analisados e a possibilidade de uma maior janela de detecção em termos de tempo. Desse modo, a verificação do estado de influenciado por uma determinada substância, ou a possibilidade de verificação de existência do seu consumo ficarão ainda mais fundamentadas.

7. Bibliografia

- 1 Cañadas E.V., Martinez A., Jerez A.; Investigación Toxicológica in Calabuig, J.A.G. (Ed.); Medicina Legal e Toxicología; Masson; 5ª Edición; Barcelona; 2001.
- 2 Tarelho S.; Implementação de Técnicas Analíticas de Determinação de Benzodiazepinas Aplicadas à Toxicologia Forense; Departamento de Química da Universidade de Aveiro; Aveiro; 2003.
- 3 Cañadas E.V., Martinez A., Jerez A.; Toxicocinética in Calabuig, J.A.G. (Ed.); Medicina Legal e Toxicología; Masson; 5ª Edición; Barcelona; 2001.
- 4 Gahlinger P.M.; Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine in *American Family Physician*; 2004; **69(11)** 2619-2626.
- 5 Weir, W; Raves: a review of the culture, the drugs and the prevention of harm; *Canadian Medical Association Journal*; 2000; **162(13)** 1843-1848.
- 6 Smith K.M., Larive L.L., Romanelli F.; Club Drugs: methylenedioxymethamphetamine, Flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and γ -hydroxybutyrate; *American Journal of Health-System Pharmacists*; 2002; **59** 1067-1076.
- 7 Simons J.S., Gaher R.M., Correia C.J., Bush J.A.; Club Drug Use Among College Students; *Addictive Behaviors*; 2005; **30** 1619-1624.
- 8 Hopfer C., Mendelson B., Van Leeuwen J.M. Kelly S., Hooks S.; Club Drug Use Among Youths in Treatment for Substance Abuse; *The American Journal of Addictions*; 2006; **15** 94-99.
- 9 Kelly B.; Conceptions of Risk in the Lives of Club Drug-using Youth; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1443-1459.
- 10 NIDA Info Facts; Club Drugs; National Institute on Drug Abuse – National Institute of Health – U.S. Department of Health and Human Services; 2005.
- 11 Hunt G., Evans K., Wu E., Reyes A.; Asian American Youth, The Dance Scene, and Club Drugs; *Journal of Drug Issues*; Fall 2005; **4** 695-732.
- 12 Goldsamt L.A., O'Brien J., Clatts M.C., McGuire L.S.; The Relationship Between Club Drug Use and Other Drug Use: A Survey of New York City Middle School Students; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1539-1555.
- 13 Britt G.C., McCance-Katz E.F.; A Brief Overview of the Clinical Pharmacology of “Club Drugs”; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1189-1201.
- 14 Uys J.D.K., Niesink R.J.M.; Pharmacological Aspects of the Combined Use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and Gamma-hydroxybutyric Acid (GHB): a Review of the Literature; *Drug and Alcohol Review*; 2005; **24** 359-368.
- 15 Brown S.D., Rhodes D.J., Pritchard B.J.; A Validated SPME-GC-MS Method for Simultaneous Quantification of Club Drugs in Human Urine; *Forensic Science International*; 2006; doi:10.1016/j.forsciint.2006.10.015.
- 16 Ricaurte G.A., McCann U.D.; Recognition and Management of Complications of New Recreational Drugs; *The Lancet*; 2005; **365** 2137-2145.
- 17 Leshner A.I. et al.; Hallucinogens and Dissociative Drugs; NIDA Research Report Series; National Institute on Drug Abuse – National Institute of Health – U.S. Department of Health and Human Services; 2001.
- 18 Thomas Y., Lambert E.Y.; Foreward; *Substance Use and Misuse – Club Drugs Special Issue*; 2005; **40** 1185-1187.

-
- 19 Maxwell J.C.; Party Drugs: Properties, Prevalence, Patterns and Problems; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1203-1240.
- 20 McCaughan J.A., Carlson, R.G., Falck R.S., Siegal H.A.; From “Candy Kids” to “Chemi-Kids”: A Typology of Young Adults who Attend Raves in the Midwestern United States; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1503-1523.
- 21 Drummer O.H., Gerostamoulos J.; Postmortem Drug Analysis: Analytical and Toxicological Aspects; *Therapeutic Drug Monitoring*; **24** 199-209; Lippincott Williams & Wilkins, Inc.; Philadelphia; 2002.
- 22 Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B.; Clarke’s Analysis of Drugs and Poisons; 3rd Edition; Pharmaceutical Press; Londres; 2004.
- 23 Nicholson K.L., Balster R.L.; GHB: A New and Novel Drug of Abuse; *Drug and Alcohol Dependence*; 2001; **63** 1-22.
- 24 Rodgers J., Ashton C.H., Gilvarry E., Young A.H.; Liquid Ecstasy: a new kid on the dance floor; *British Journal of Psychiatry*; 2004; **184** 104-106.
- 25 Elian A.A.; Determination of Endogenous Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB) Levels in Antemortem Urine and Blood; *Forensic Science International*; 2002; **128** 120-122.
- 26 Elian A.A.; GC-MS Determination of Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB) in Blood; *Forensic Science International*; 2001; **122** 43-47.
- 27 Elliott S., Lowe P., Symonds A.; The Possible Influence of Micro-organisms and Putrefaction in the production of GHB in Post-Mortem Biological Fluid; *Forensic Science International*; 2004; **139** 183-190.
- 28 Couper F.J., Marinetti L.J.; γ -Hydroxybutyrate (GHB) – Effects on Human Performance and Behavior; *Forensic Science Review*; 2002; **14** 101-121.
- 29 Crunelli V., Emri Z., Leresche N.; Unravelling the Brain Targets of γ -Hydroxybutyric Acid; *Current Opinion in Pharmacology*; 2006; **6** 44-52.
- 30 McCusker R.R., Paget-Wilkes H., Chronister C.W., Goldberger B.A.; Analysis of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Urine by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 1999; **23**.
- 31 Fukui Y., Matsusima E., Muramoto K., Nagai N., Ohama K., Yamashita K.; Validation of a Simple Gas Chromatographic – Mass Spectrometric Method for the Determination of Gamma-Butyrolactone in Human Plasma; *Journal of Chromatography B*; 2003; **785** 73-80.
- 32 Struys E.A., *et al*; Metabolism of γ -hydroxybutyrate to D-2-hydroxyglutarate in Mammals: Further Evidence for D-2-Hydroxyglutarate Transhydrogenase; *Metabolism Clinical and Experimental*; 2006; **55** 353-358.
- 33 Hennessy S.A., Moane S.M., McDermott S.D.; The Reactivity of Gamma – Hydroxybutyric Acid (GHB) and Gamma – Butyrolactone (GBL) in Alcoholic Solutions; *Journal of Forensic Science*; 2004; **49** 1-10.
- 34 Freese T.E., Miotto K., Reback C.J.; The Effects and Consequences of Selected Club Drugs; *Journal of Substance Abuse treatment*; 2002; **23** 151-156.
- 35 Richard D., Ling B., Authier N., Faict T.W., Eschalier A., Coudoré F.; GC/MS Profiling of γ -Hydroxybutyrate and Precursors in Various Animal Tissues Using Automatic Solid-Phase Extraction. Preliminary Investigations of Its Potential Interest in Postmortem Interval Determination; *Analytical Chemistry*; 2005; **77** 1354-1360.
- 36 Shima N., Miki A., Kamata T., Katagi M., Tsuchihashi H.; Urinary Endogenous Concentrations of GHB and Its Isomers in Healthy Humans and Diabetics; *Forensic Science International*; 2005; **149** 171-179.

- 37 Wood M., Laloup M., Samyn N., Morris M.R., de Bruijn E.A., Maes R.A., Young M.S., Maes V., de Boeck G.; Simultaneous Analysis of Gamma-Hydroxybutyric Acid and its Precursors in Urine using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography A*; 2004; **1056** 83-90.
- 38 Anderson I.B., Kim S.Y., Dyer J.E., Burkhardt C.B., Iknoian J.C., Walsh M.C., Blanc P.D.; Trends in γ -Hydroxybutyrate (GHB) and Related Drug Intoxication: 1999 to 2003; *Annals of Emergency Medicine*; 2006; **47** 177-183.
- 39 Moriya F., Hashimoto Y.; Endogenous γ -hydroxybutyric Acid Levels in Postmortem Blood; *Legal Medicine*; 2004; **6** 47-51.
- 40 Sassenbroeck D.K., Neve N., Paepe P., Belpaire F.M., Verstraete A.G., Calle P.A., Buylaert W.A.; Abrupt Awakening Phenomenon Associated with Gamma-Hydroxybutyrate Use: a Case Series; *Clinical Toxicology*; 2007; **45** 533-538.
- 41 Dimitrijevic N., Dzitoyeva S., Satta R., Imbesi M., Yildiz S., Manev H.; Drosophila GABAB Receptors Are Involved in Behavioral Effects of γ -Hydroxybutyric Acid (GHB); *European Journal of Pharmacology*; 2005; **519** 246-252.
- 42 Negrusz A., Gaensslen R.E.; Analytical Developments in Toxicological Investigation of Drug-facilitated Sexual Assault; *Anal Bioanal Chem*; 2003; **376** 1192-1197.
- 43 Frucht S.J., Bordelon Y., Houghton W.H., Reardan D.; A Pilot Tolerability and Efficacy Trial of Sodium Oxybate in Ethanol-Responsive Movement Disorders; *Movement Disorders*; 2005; **20** 1330-1337.
- 44 Cook C.D., Biddlestone L., Coop A., Beardsley P.M.; Effects of Combining Ethanol (EtOH) with gamma-hydroxybutyrate (GHB) on the Discriminative Stimulus, Locomotor, and Motor-impairing Functions of GHB in Mice; *Psychopharmacology*; 2006; **185** 112-122.
- 45 Elian A.A.; A Novel Method for GHB Detection in Urine and Its Application in Drug-Facilitated Sexual Assaults; *Forensic Science International*; 2000; **109** 183-187.
- 46 Moriya F., Hashimoto Y.; Site-Dependent Production of γ -hydroxybutyric Acid in the Early Postmortem Period; *Forensic Science International*; 2005; **148** 139-142.
- 47 Marinetti L.J., Isenschmid D.S., Hepler B.R., Kanlun S.; Analysis of GHB and 4-Methyl-GHB in Postmortem Matrices after Long-Term Storage; *Journal of Analytical Toxicology*; 2005; **29**.
- 48 Elliott S.; Gamma Hydroxybutyric Acid (GHB) Concentrations in Humans and Factors Affecting Endogenous Production; *Forensic Science International*; 2003; **133** 9-16.
- 49 Zvosec D.L., Smith S.W.; Agitation is Common in γ -Hydroxybutyrate Toxicity; *The American Journal of Emergency Medicine*; 2005; **23** 316-320.
- 50 Tateo F., Bononi M.; Determination of Gamma-butyrolactone (GBL) in Foods by SBSE-TD/GC/MS; *Journal of Food Composition and Analysis*; 2003; **16** 721-727.
- 51 Skopp G.; Preanalytic Aspects in Postmortem Toxicology; *Forensic Science International*; 2004; **142** 75-100.
- 52 Copeland J., Dillon P.; The Health and Psycho-social Consequences of Ketamine Use; *International Journal of Drug Policy*; 2005; **16** 122-131.
- 53 Lalonde B.R., Wallage H.R.; Postmortem Blood Ketamine Distribution in Two Fatalities; *Journal of Analytical Toxicology*; 2004; **28** 71-74.
- 54 Chou S., Yang M., Ling Y., Giang Y.; Gas-Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry Preceded by Liquid-Liquid Extraction and Chemical Derivatization for the Determination of Ketamine and Norketamine in Urine; *Journal of Chromatography B*; 2004; **799** 37-50.

- 55 Huang M., Liu C., Li J., Huang S. ; Quantitative Detection of Ketamine, norketamine and dehydronorketamine in Urine Using Chemical Derivatization Followed by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography B*; 2005; **820** 165-173.
- 56 Breitmeier D., Passie T., Mansouri F., Albrecht K., Kleemann W.J. ; Autoerotic Accident Associated with Self-applied Ketamine; *International Journal of Legal Medicine*; 2002; **116** 113-116.
- 57 Mozayani A., Schrode P., Carter J., Danielson J.; A Multiple Drug Fatality Involving MK-801 (dizocilpine), a Mimic of Phencyclidine; *Forensic Science International*; 2003; **133** 113-117.
- 58 Wylie F.M., Torrance H., Anderson R.A., Oliver J.S.; Drugs in Oral Fluid Part I. Validation of an Analytical Procedure for Licit and Illicit Drugs in Oral Fluid; *Forensic Science International*; 2005; **150** 191-198.
- 59 Olmos-Carmona M.L., Hernández-Carrasquilla M.; Gas-Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Veterinary Tranquilizers in Urine: Evaluation of Method Performance; *Journal of Chromatography B*; 1999; **734** 113-120.
- 60 Bogusz M.J. (ed.) et al; Handbook of Analytical Separations – Vol. 2 – Forensic Science; Elsevier Science B.V.; Amesterdão; 2000.
- 61 Schneider S., Kuffer P. Wennig R.; Determination of Lysergide (LSD) and Phencyclidine in biosamples; *Journal of Chromatography B*; 1998; **713** 189-200.
- 62 Nelson C.C., Foltz R.L.; Determination of Lysergic Acid Diethylamide (LSD), Iso-LSD, and N-Demethyl-LSD in Body Fluids by Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; *Analytical Chemistry*; 1992; **54** 1578-1585.
- 63 Libong D., Bouchonnet S., Ricordel I.; A Selective and Sensitive Method for Quantitation of Lysergic Acid Diethylamide (LSD) in Whole Blood by Gas Chromatography-Ion Trap Tandem Mass Spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 2003; **27** 24-29.
- 64 Clarkson E.D., Lesser D., Paul B.D.; Effective GC-MS Procedure for Detecting iso-LSD in Urine after Base-Catalyzed Conversion to LSD; *Clinical Chemistry*; 1998; **44** 287-292.
- 65 Reuschel S.A., Eades D., Foltz R.L.; Recent Advances in Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for Determination of LSD and its Metabolites in Physiological Specimens; *Journal of Chromatography B*; 1999; **733** 145-159.
- 66 Segura J., Ventura R., Jurado C.; Derivatization Procedures for Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Xenobiotics in Biological Samples, with Special Attention to Drugs of Abuse and Doping Agents; *Journal of Chromatography B*; 1998; **713** 61-90.
- 67 Poch G.K. et al.; Detection of Metabolites of Lysergic Acid Diethylamide (LSD) in Human Urine Specimens: 2-oxo-3-hydroxy-LSD, a Prevalent Metabolite of LSD; *Journal of Chromatography B*; 1999; **724** 23-33.
- 68 Nakahara Y., Kikura R., Takahashi K.; Detection of LSD and Metabolite in Rat Hair and Human Hair; *Journal of Analytical Toxicology*; 1996; **20**.
- 69 Levine B. (ed.); Principles of Forensic Toxicology; 2nd Edition; AACC Press; Washington; 2003.
- 70 Gaillard Y., Pépin G.; Gas Chromatographic - Mass Spectrometric Quantitation of Dextropropoxyphene and Norpropoxyphene in Hair and Whole Blood After Automated On-line Solid-Phase Extraction: Application in Twelve Fatalities; **Journal of Chromatography B**; 1998; **709** 69-77.

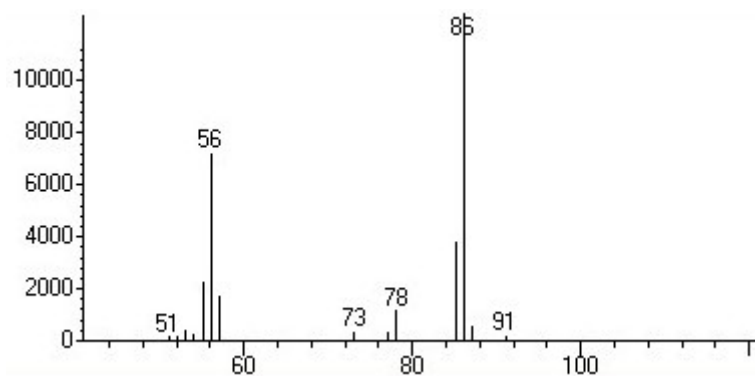
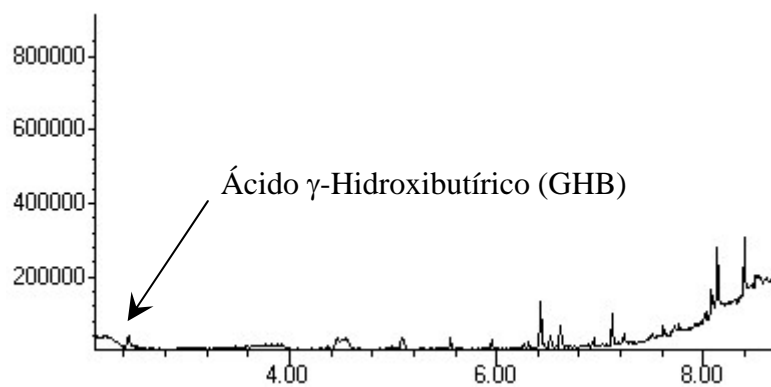
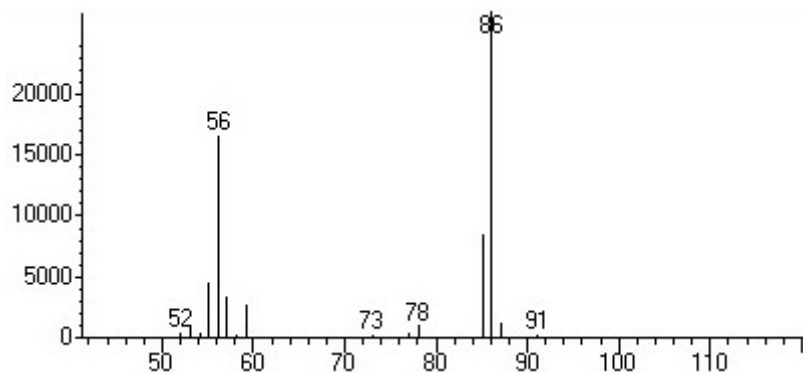
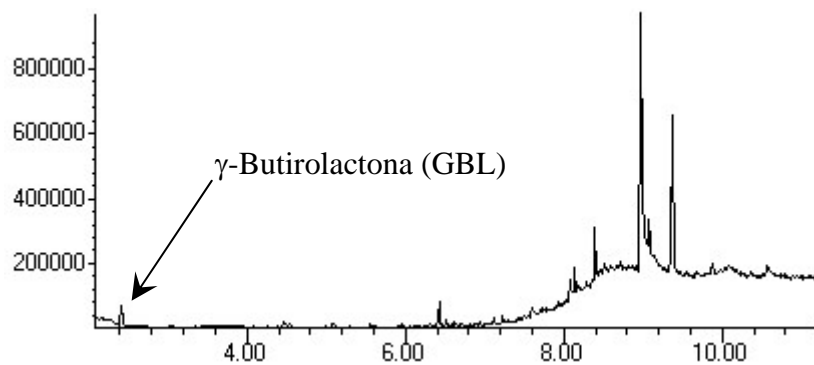
- 71 Lakso H., Norström Å.; Determination of Dextropropoxyphene and Nordextropropoxyphene in Urine by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography B*; 2003; **794** 57-65.
- 72 Mersch F., Yegles M., Wennig R.; Quantification of Dextropropoxyphene and its Metabolite by HPLC in Hair of Overdose Cases; *Forensic Science International*; 1997; **84** 237-242.
- 73 Goldstein D.J., Turk D.C.; Dextropropoxyphene Safety and Efficacy in Older Patients; *Drugs Aging*; 2005; **22** 419-432.
- 74 Schifano F., Deluca P., Baldacchino A.; Online Availability of Dextropropoxyphene Over Time, 2003-2005; 2006; *CyberPsychology & Behavior*; **9** 404-409.
- 75 Riascos R., Kumfa P., Rojas R., Cuellar H., Descartes F.; Fatal Methadone Intoxication in a Child; *Emergency Radiology*; 2007.
- 76 Couper F.J., Chopra K., Pierre-Louis M.L.Y.; Fatal Methadone Intoxication in an Infant; *Forensic Science International*; 2005; **153** 71-73.
- 77 Vanbinst R., Koenig J., Di Fazio V., Hassoun A.; Bile Analysis of Drugs in Postmortem Cases; *Forensic Science International*; 2002; **128** 35-40.
- 78 Hackett J., Elian A.A.; Extraction and Analysis of Flunitrazepam/7-Aminoflunitrazepam in Blood and Urine by LC-PDA and GC-MS using Butyl SPE Columns; *Forensic Science International*; 2006; **157** 156-162.
- 79 Druid H., Holmgren P., Ahlner J.; Flunitrazepam: an Evaluation of Use, Abuse and Toxicity; *Forensic Science International*; 2001; **122** 136-141.
- 80 Dumasia M.C.; Identification of some N-hydroxylated Metabolites of (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine in Horse Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry; *Xenobiotica*; 2003; **33** 1013-1025.
- 81 Becker J., Neis P., Röhrich J., Zörntlein S.; A Fatal Paramethoxymethamphetamine Intoxication; *Legal Medicine*; 2003; **5** S138-S141.
- 82 Soares M.E., Carvalho M., Carmo H., Remião F., Carvalho F., Bastos M.L.; Simultaneous Determination of Amphetamine Derivatives in Human Urine After SPE Extraction and HPLC-UV Analysis; *Biomedical Chromatography*; 2004; **18** 125-131.
- 83 Fineschi V., Centini F., Mazzeo E., Turillazzi E.; Adam (MDMA) and Eve (MDEA) Misuse: an Immunohistochemical Study on Three Fatal Cases; *Forensic Science International*; 1999; **104** 65-74.
- 84 Kankaanpää A., Gunnar T., Ariniemi K., Lillsunde P., Mykkänen S., Seppälä T.; Single-Step Procedure for Gas Chromatography-Mass Spectrometry Screening and Quantitative Determination of Amphetamine-type Stimulants and related Drugs in Blood, Serum, Oral Fluid and Urine Samples; *Journal of Chromatography B*; 2004; **810** 57-68.
- 85 Gentili S., Torresi A., Marsili R., Chiarotti M., Macchia T.; Simultaneous Detection of Amphetamine-like Drugs with Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography B*; 2002; **780** 183-192.
- 86 Klys M. et al.; Fatality Due to the Use of a Designer Drug MDMA (Ecstasy); *Legal Medicine*; 2007; doi: 10.1016/j.legalmed.2006.12.004.
- 87 Scheidweiler K.B., HUestis M.A.; A Validated Gas Chromatographic-Electron Impact Ionization Mass Spectrometric Method of Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), Methamphetamine and Metabolites in Oral Fluid; *Journal of Chromatography B*; 2006; **835** 90-99.
- 88 Drummer O.H.; Postmortem Toxicology of Drugs of Abuse; *Forensic Science International*; 2004; **142** 101-113.

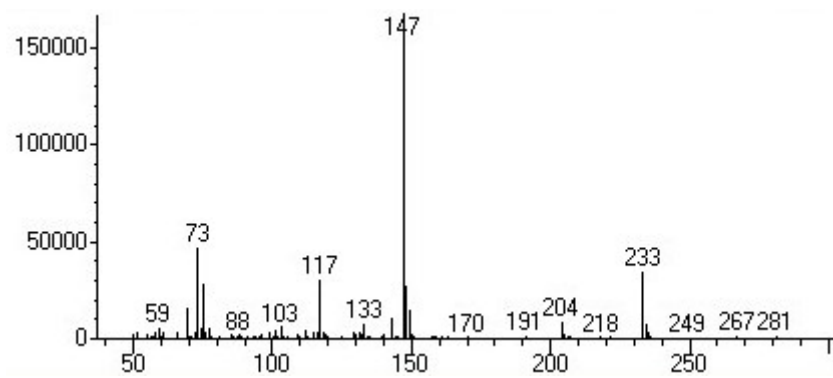
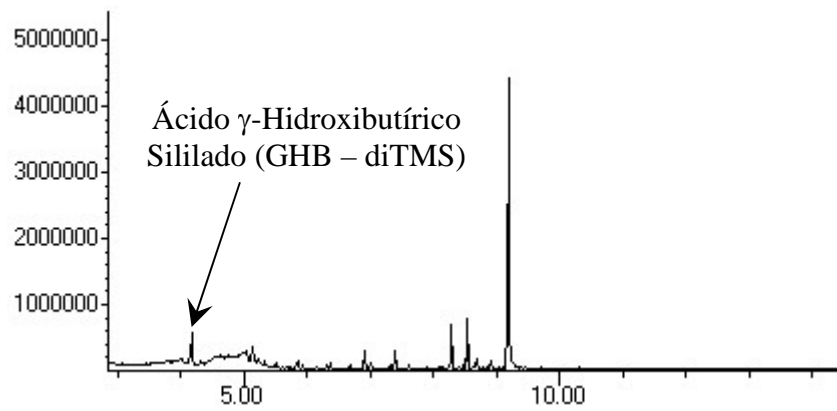
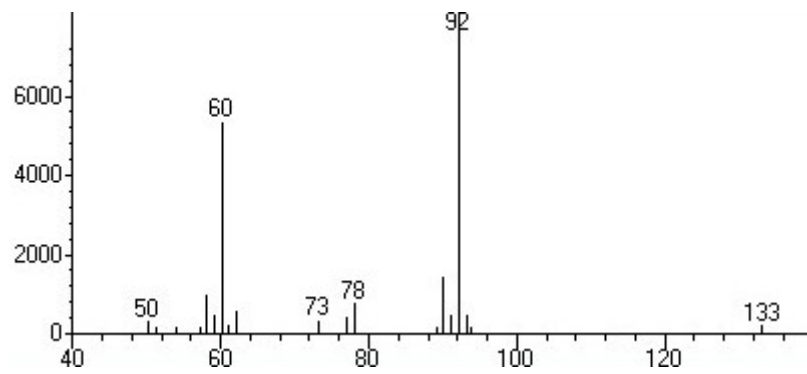
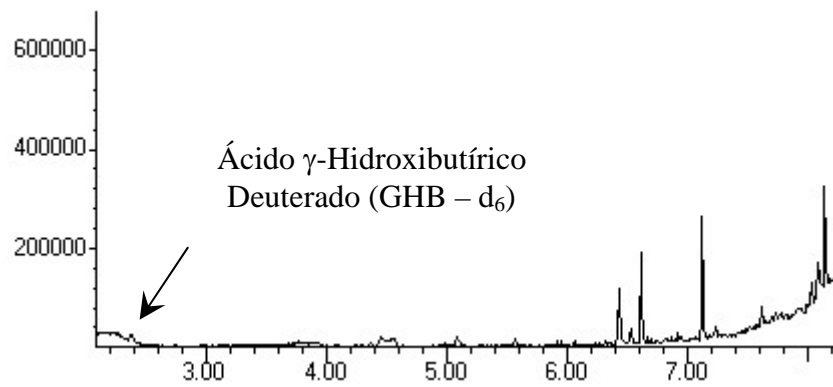
- 89 Melgar R., Kelly R.C.; A Novel GC/MS Derivatization Method for Amphetamines; *Journal of Analytical Toxicology*; 1993; **17** 399-402.
- 90 Keen J., Oliver P.; Commissioning Pharmacological Treatments for Drug Users: a Brief Review of the Evidence Base; *Drugs: Education, Prevention and Policy*; 2004; **11-2** 149-156.
- 91 Gunnar T., Eskola T., Lillsunde P.; Fast Gas Chromatography/Mass Spectrometric Assay for the Validated Quantitative Determination of Methadone and the Primary Metabolite EDDP in Whole Blood; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; 2006; **20** 673-679.
- 92 Bernard J.P., Opdal M.S., Karinen R., Mørland J., Khiabani H. Z.; Relationship Between Methadone and EDDP (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine) in Urine Samples from Norwegian Prisons; *European Journal of Clinical Pharmacology*; 2007.
- 93 Kintz P.; A New Series of 13 Buprenorphine-related Deaths; *Clinical Biochemistry*; 2002; **35** 513-516.
- 94 George S., George C., Chauhan M.; The Development and Application of a Rapid Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method to Monitor Buprenorphine Withdrawal Protocols; *Forensic Science International*; 2004; **143** 121-125.
- 95 Pirnay S., Bouchonnet S., Hervé F., Libong D., Milan N., d'Athis P., Baud F., Ricordel I.; Development and Validation of a Gas Chromatography – Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Buprenorphine, Flunitrazepam and their Metabolites in Rat Plasma: Application to the Pharmacokinetic Study; *Journal of Chromatography B*; 2004; **807** 335-342.
- 96 Lisi A.M., Kazlauskas R., Trout G.J.; Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Quantitation of Urinary Buprenorphine and Norbuprenorphine after Derivatization by Direct Extractive Alkylation; *Journal of Chromatography B*; 1997; **692** 67-77.
- 97 Hadidi K.A., Oliver J.S.; Stability of Morphine and Buprenorphine in Whole Blood; *International Journal of Legal Medicine*; 1998; **111** 165-167.
- 98 Alho H., Sinclair D., Vuori E., Holopainen A.; Abuse Liability of Buprenorphine – Naloxone Tablets in Untreated IV Drug Users; *Drug and Alcohol Dependence*; 2007; **88** 75-78.
- 99 Greenwald M., Johanson C., Bueller J., Chang Y., Moody D.E., Kilbourn M., Koeppe R., Zubieta J.; Buprenorphine Duration of Action: Mu-opioid Receptor Availability and Pharmacokinetic and Behavioral Indices; *Journal of Biological Psychiatry*; 2007; **61** 101-110.
- 100 Baselt R., Cravey R.; Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man; 3rd ed.; Year Book Medical Publishers, Inc.; Chicago; 1989.
- 101 Franke J.P., de Zeeuw R.A.; Solid-Phase Extraction in Systematic Toxicological Analysis; *Journal of Chromatography B*; 1998; **713** 51-59.
- 102 Musshoff F., Padosch S., Steinborn S., Madea B.; Fatal Blood and Tissue Concentrations of more than 200 Drugs; *Forensic Science International*; 2004; **142** 161-210.
- 103 Stimpfl T., Vycudilik W.; Automatic Screening in Postmortem Toxicology; *Forensic Science International*; 2004; **142** 115-125.
- 104 Paterson S., Cordero R., Burlinson S.; Screening and Semi-Quantitative Analysis for Basic Drugs Using Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography B*; 2004; **813** 323-330.

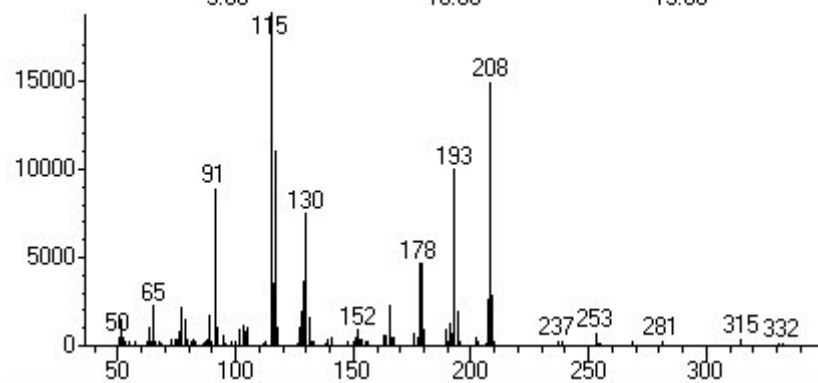
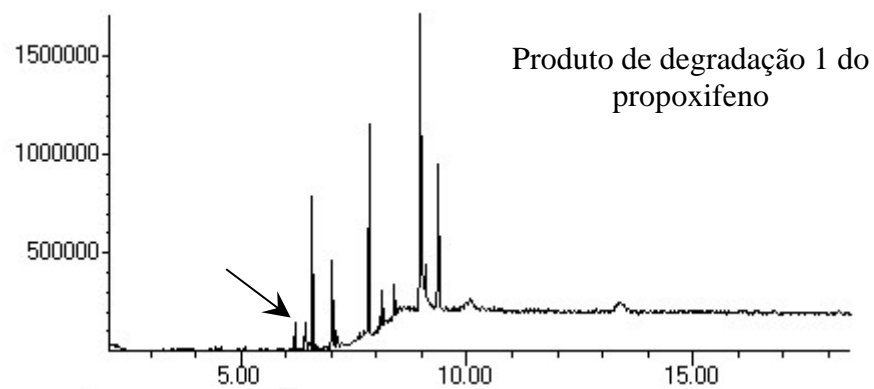
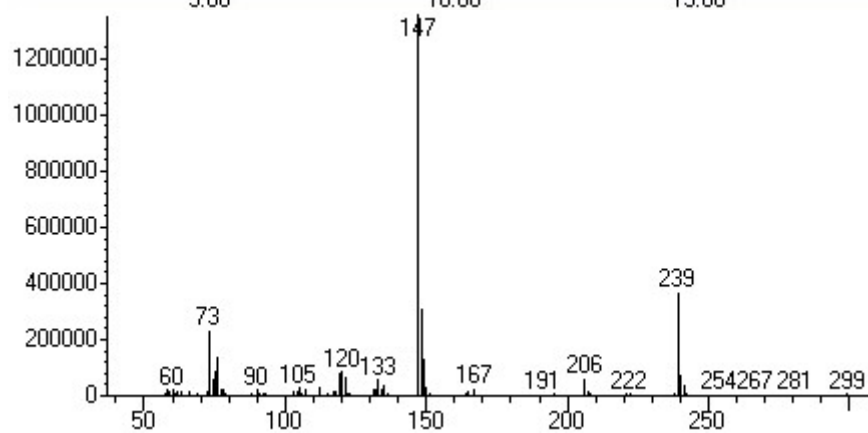
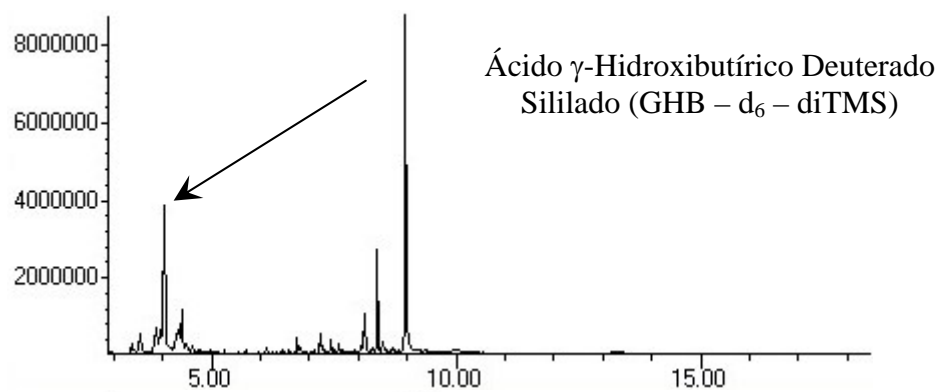
-
- 105 Christian G.D.; Analytical Chemistry; 6th Ed. – Wiley International Edition; John Wiley Sons; Hoboken; 2004.
- 106 Soriano T., Jurado C., Menéndez M., Repetto M.; Improved Solid-Phase Extraction Method for Systematic Toxicological Analysis in Biological Fluids; *Journal of Analytical Toxicology*; 2001; **25** 137-143.
- 107 Waters; Oasis® Pharmaceutical Applications Notebook; Waters Corporation; Milford; 2002.
- 108 Waters; Oasis® Applications Notebook; Waters Corporation; Milford; 2002.
- 109 Knapp D.R.; Handbook of Analytical Derivatization Reactions; Wiley Interscience Publication; Nova Iorque; 1979.
- 110 Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A.; Principles of Instrumental Analysis; 5th Ed.; Thomson Learning; Belmont; 1998.
- 111 Gunnar T., Ariniemi K., Lillsunde P.; Validated Toxicological Determination of 30 Drugs of Abuse as Optimized Derivatives in Oral Fluid by Long Column Fast Gas Chromatography/Electron Impact Mass Spectrometry; *Journal of Mass Spectrometry*; 2005; **40** 739-753.
- 112 Chasin A.A.M., Nascimento E.S., Ribeiro-Neto L.M., Siqueira M.E.P.B., Andraus M.H., Salvadori M.C., Fernícola N.A.G., Gorni R., Salcedo S.; Validação de Métodos em Análises Toxicológicas: uma Abordagem Geral; *Revista Brasileira de Toxicologia*; 1998; **11** 1-6.
- 113 Castro A. *et al.*; Guia RELACRE 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química; RELACRE; Lisboa; 2000.
- 114 Coutinho F., Uso do Método de LC-DAD-MS na Análise de Benzodiazepinas em Amostras post-mortem; Departamento de Química da Universidade de Aveiro; Aveiro; 2007.
- 115 Proença P., Teixeira H., Pinheiro J., Marues E.P., Vieira D.N.; Forensic Intoxication with Clobazam: HPLC/DAD/MSD Analysis; *Forensic Science International*; 2004; **143** 205-209.
- 116 Millard B.J., Sheinin E.B., Benson W.R.; Thermal Decomposition of Propoxyphene during GLC Analysis; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1980; **69/10** 1177-1179.
- 117 The International Association of Forensic Toxicologists; Therapeutic and Toxic Drug Concentrations List; www.tiaft.org (consulta em 05/01/2007).
- 118 Drummer O.; Post-Mortem Toxicology; *Forensic Science International*; 2007; **165** 199-203.
- 119 Gentili S., Cornetta M., Macchia T.; Rapid Screening Procedure Based on Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Detection of Many Recreational Drugs in Hair; *Journal of Chromatography B*; 2004; **801** 289-296.

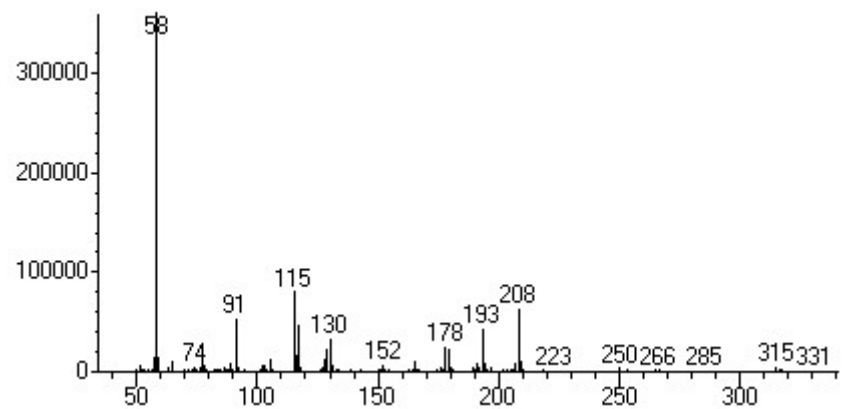
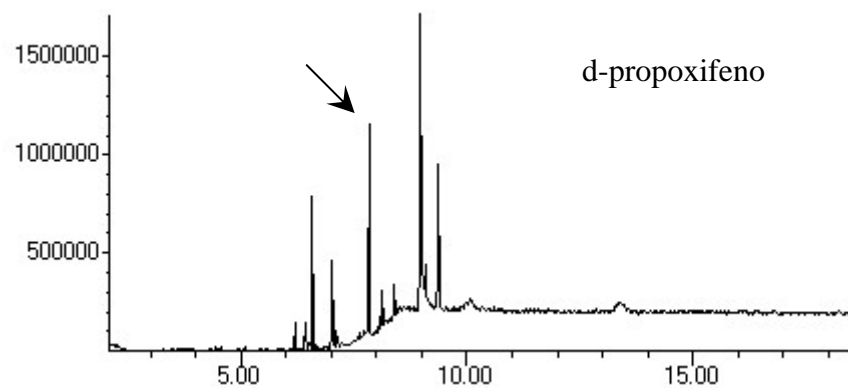
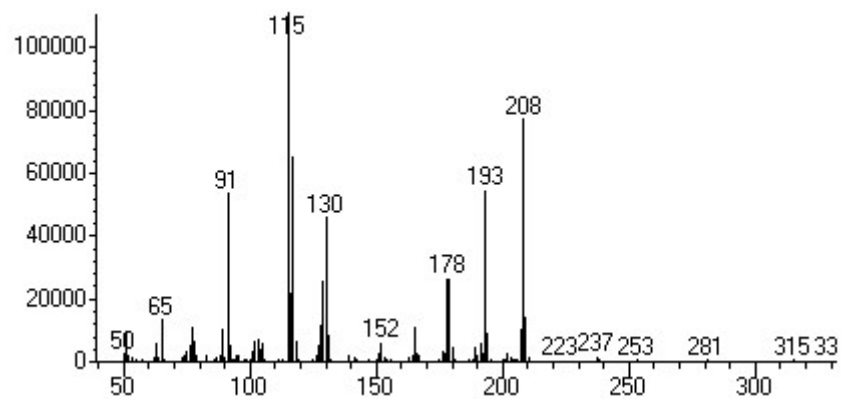
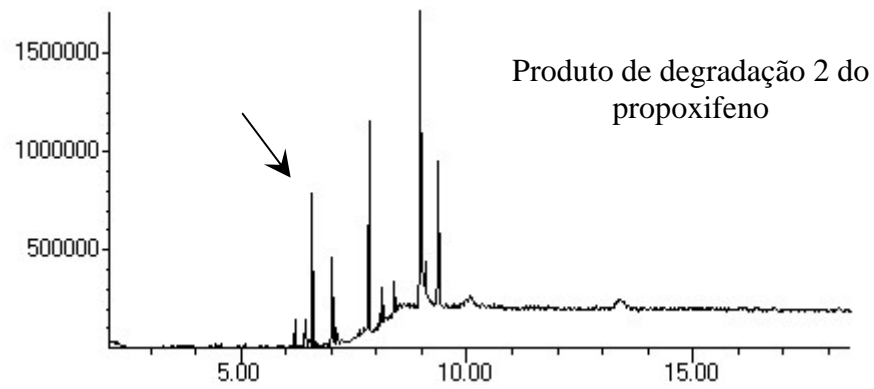
ANEXOS

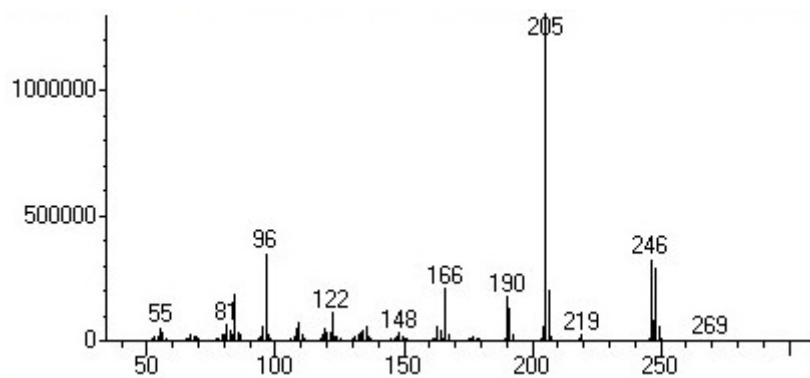
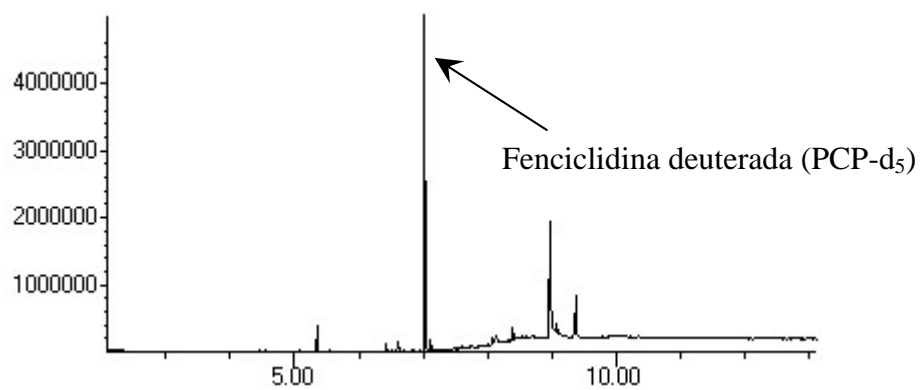
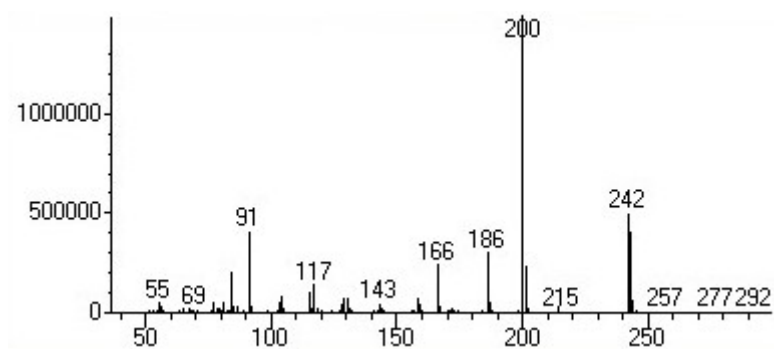
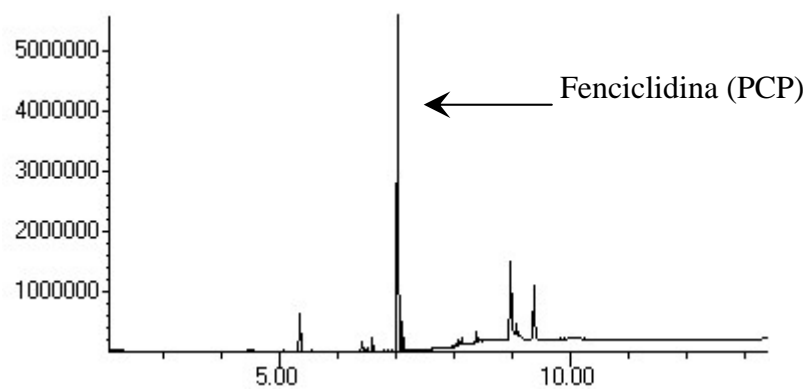
Anexo 1 – Cromatogramas e Espectros de Massa em Modo SCAN

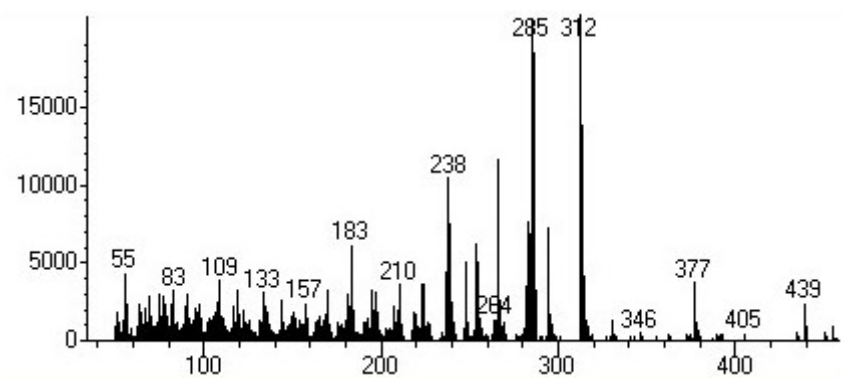
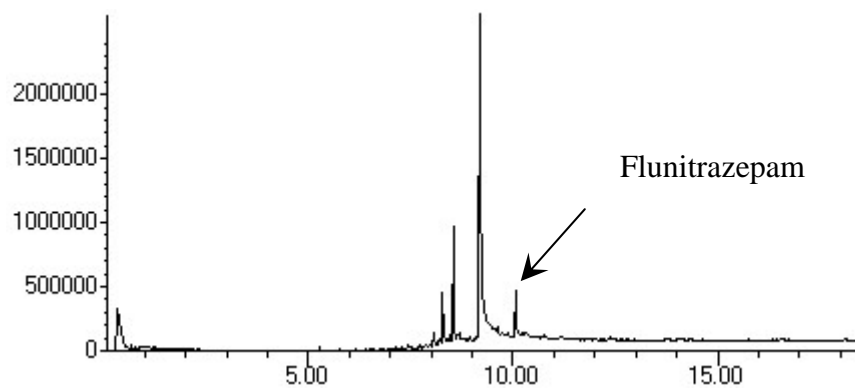
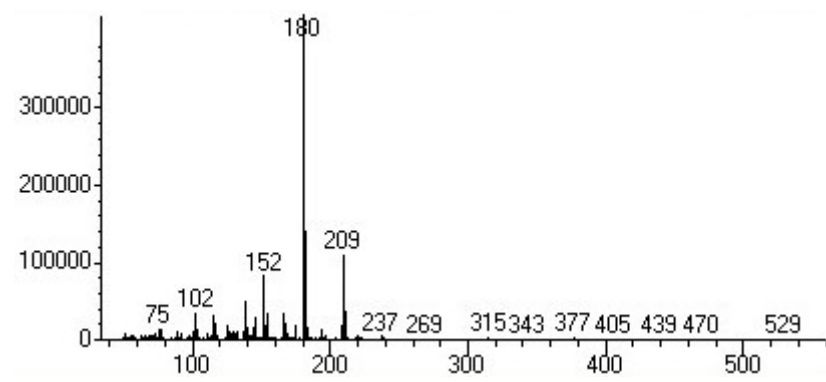
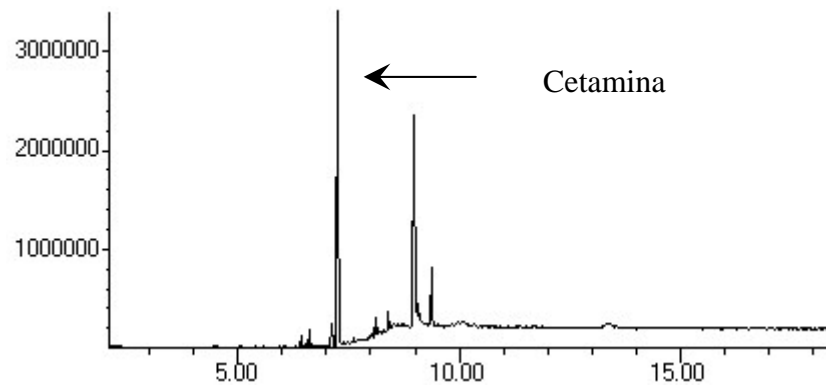


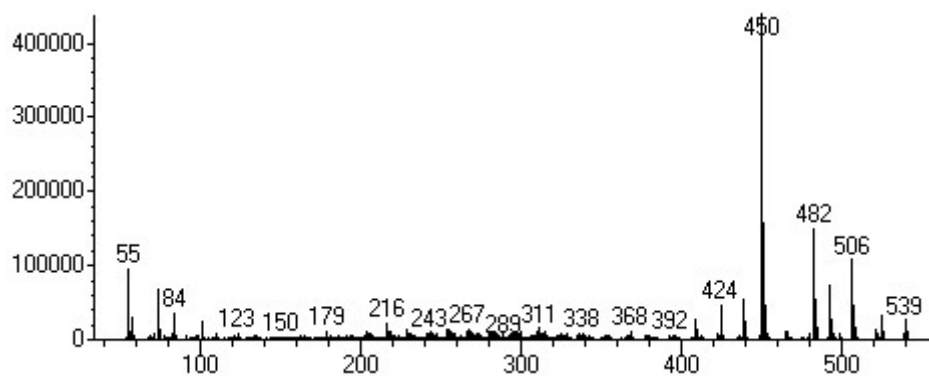
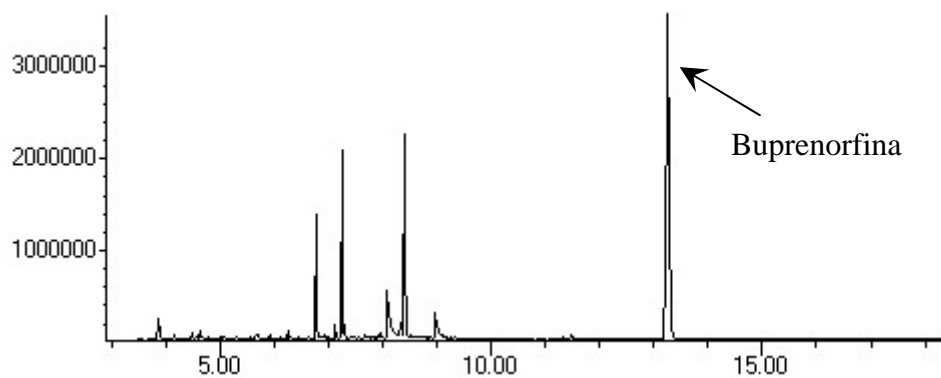
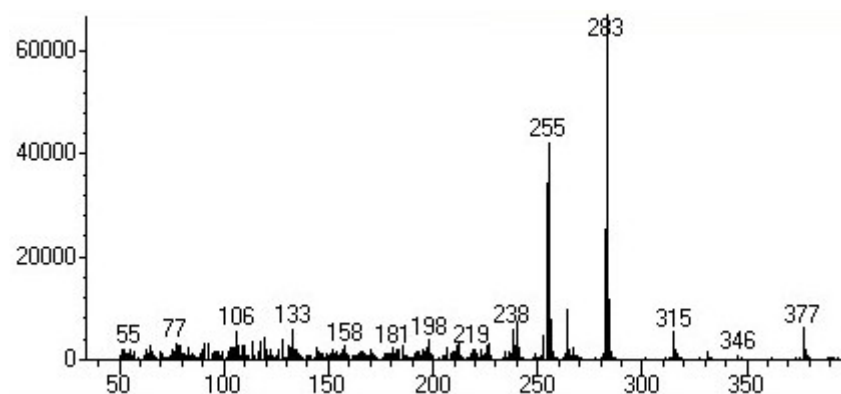
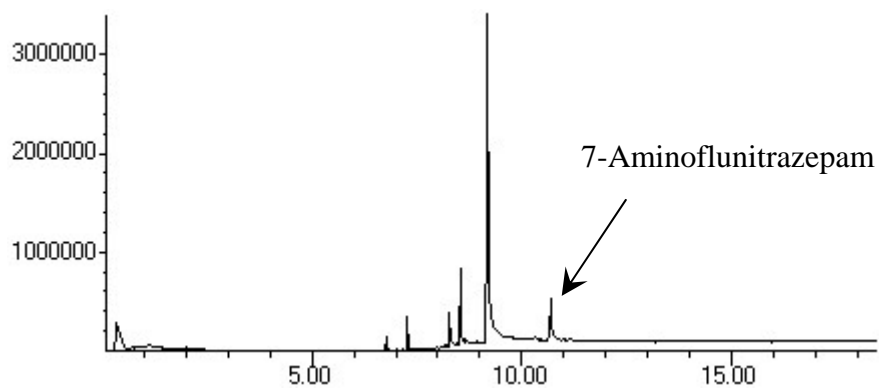


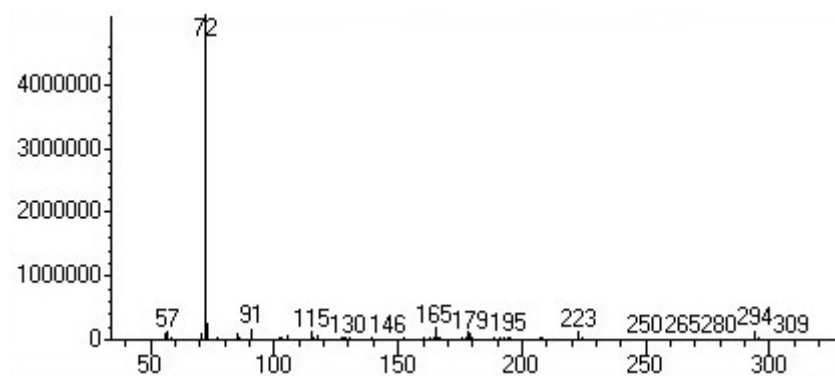
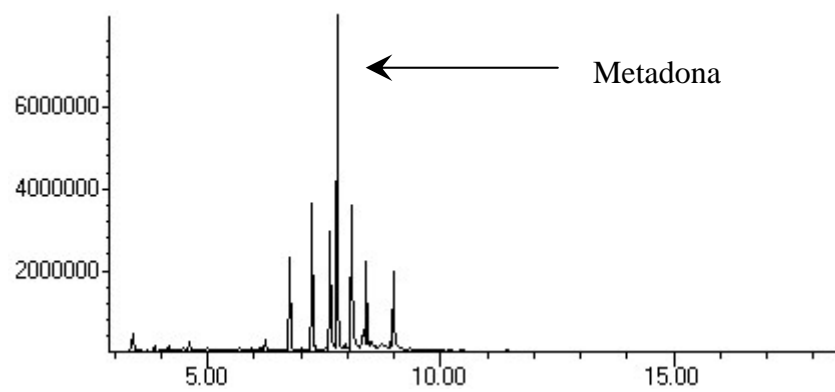






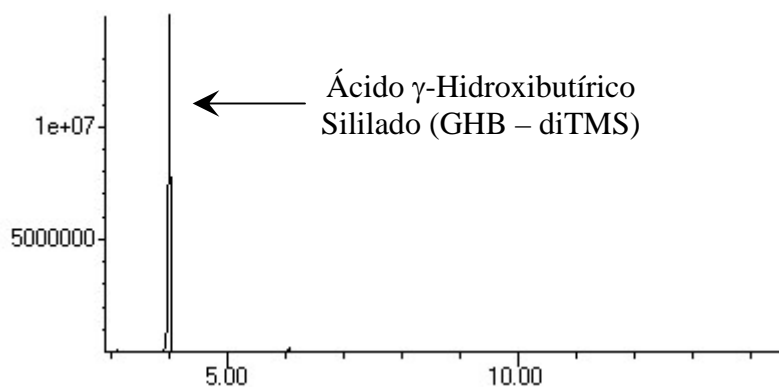
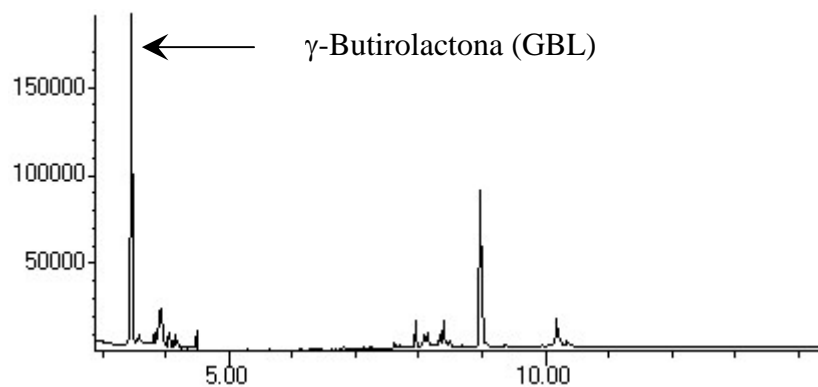


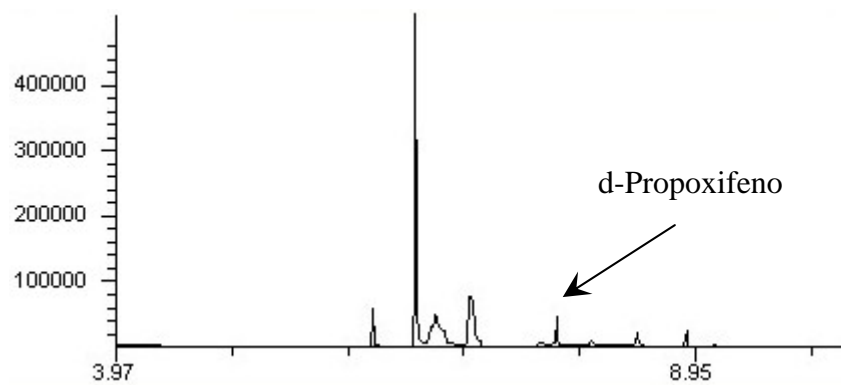
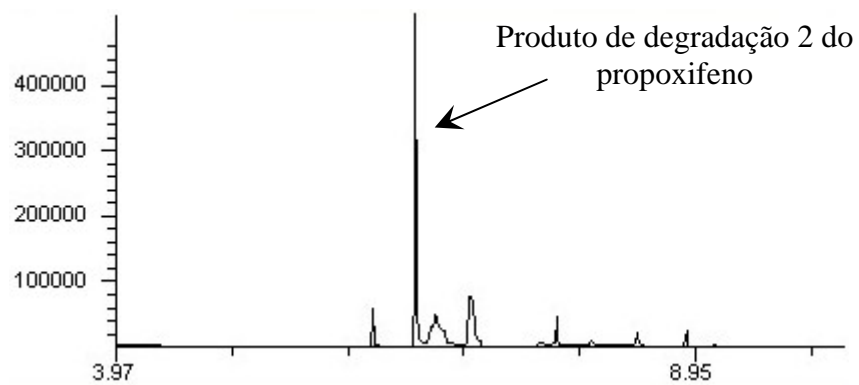
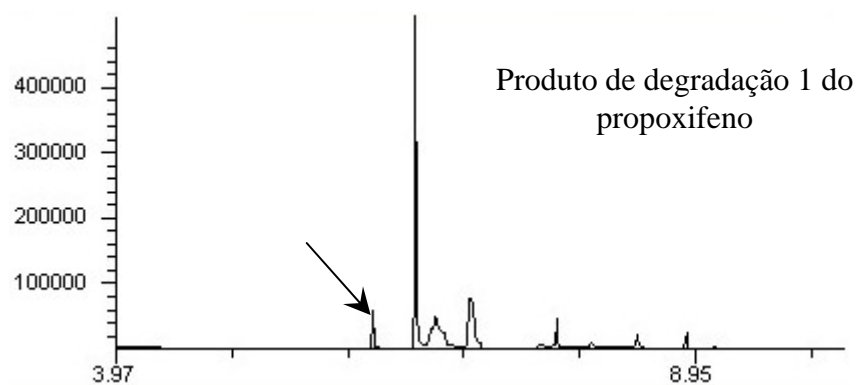
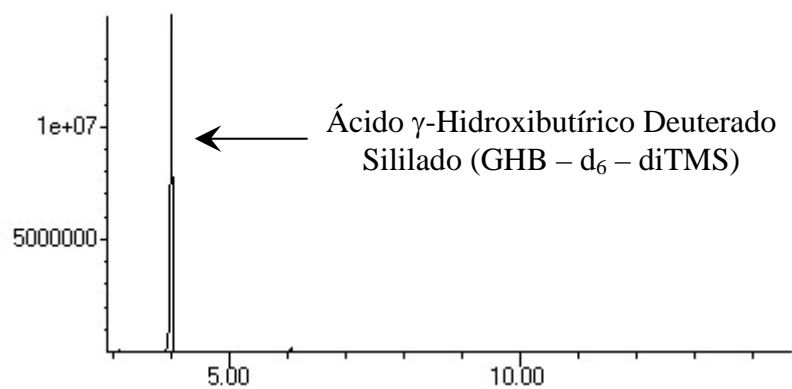


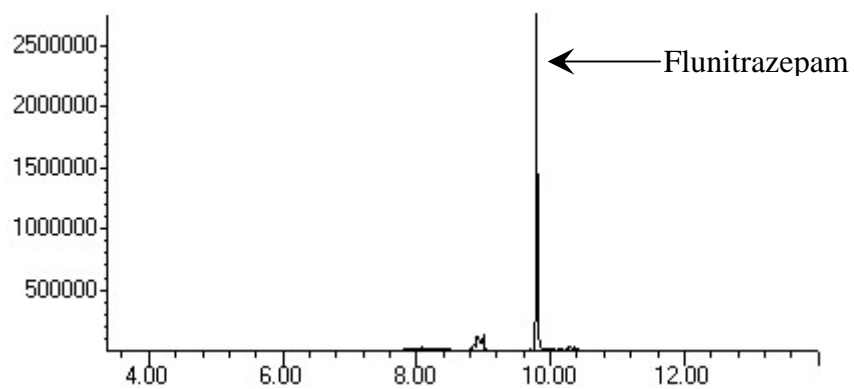
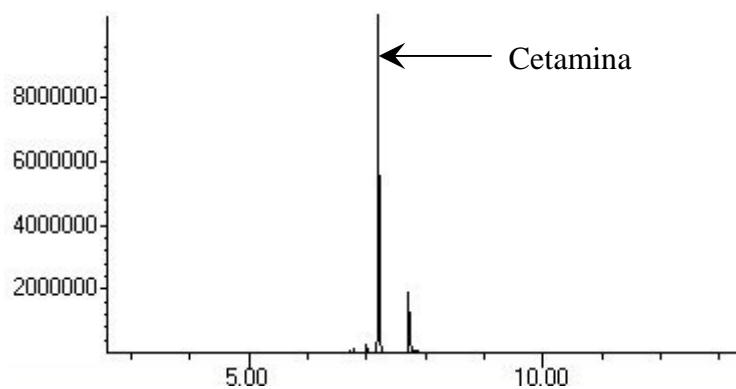
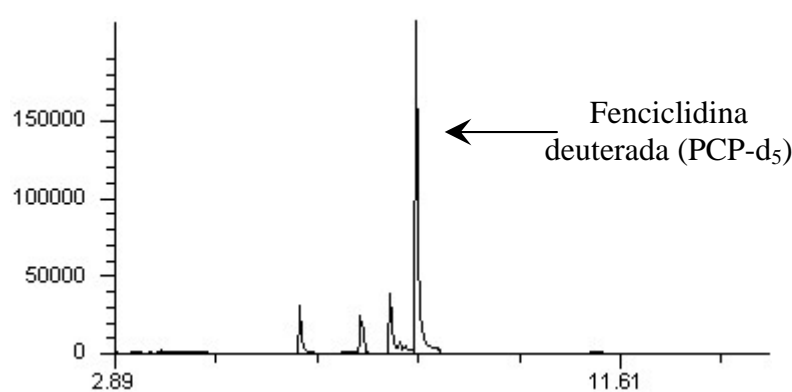
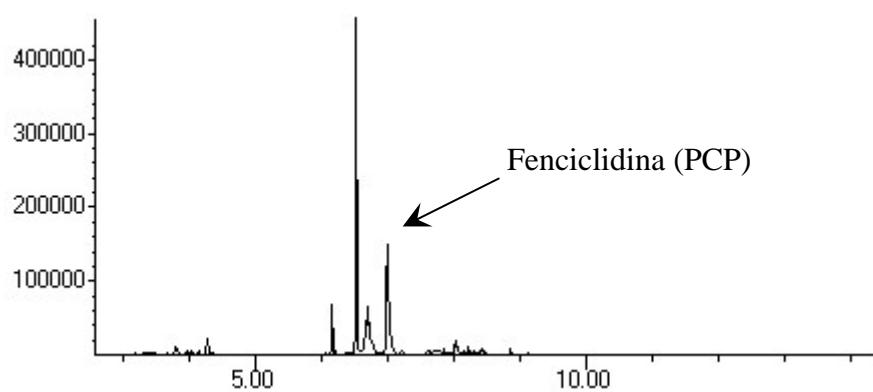


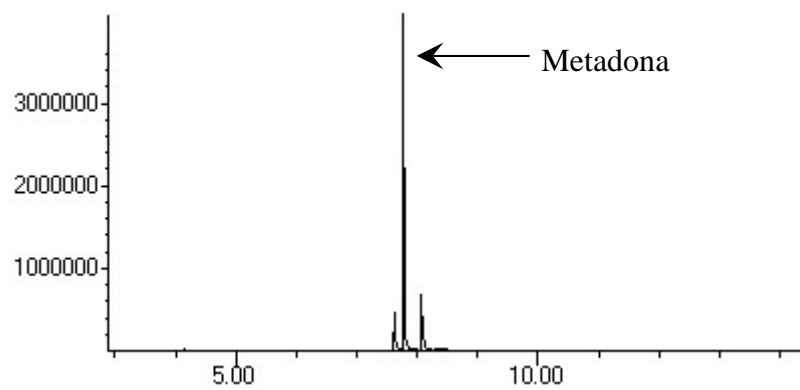
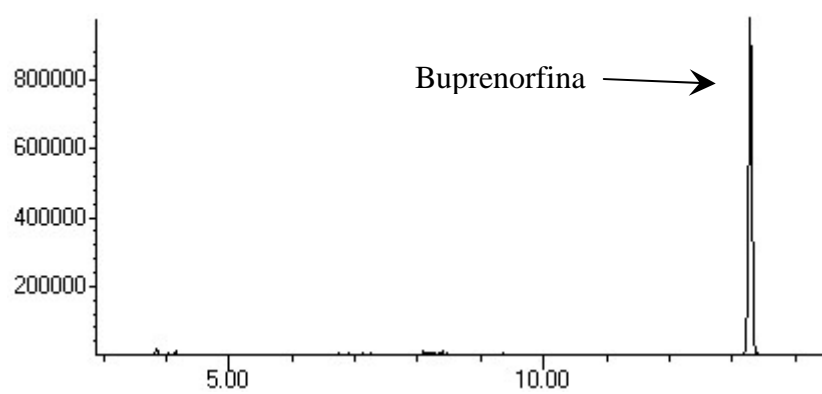
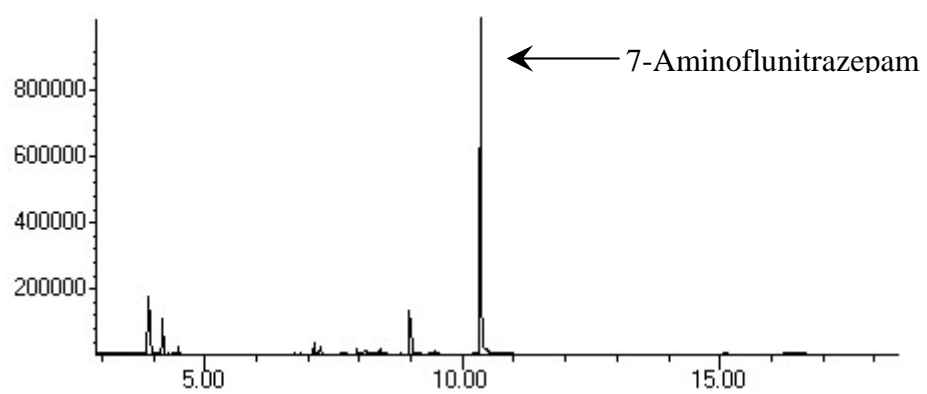
Anexo 2 – Cromatogramas em Modo SIM

Substância	Tempo de Retenção (min)	Iões escolhidos para SIM (<i>m/z</i>)
GBL (1)	3,10	86, 56
GHB – d₆ – diTMS (2)	3,98	120, 239
GHB – diTMS (3)	4,01	117, 233
Produto de degradação do propoxifeno 1 (4)	6,20	91, 115, 193, 208
Produto de degradação do propoxifeno 2 (5)	6,54	91, 115, 193, 208
PCP (6)	7,05	91, 200, 242, 243
PCP-d₅ (7)	7,05	96, 205, 246, 248
Cetamina (8)	7,21	180, 182, 209
d – Propoxifeno (9)	7,76	58, 91, 115, 193, 208
Metadona (10)	7,77	72, 294, 309
Flunitrazepam (11)	9,78	238, 266, 285, 286, 312, 313
7-aminoflunitrazepam (12)	10,36	254, 255, 282, 283
Buprenorfina-TMS (13)	12,54	450, 451, 482, 506



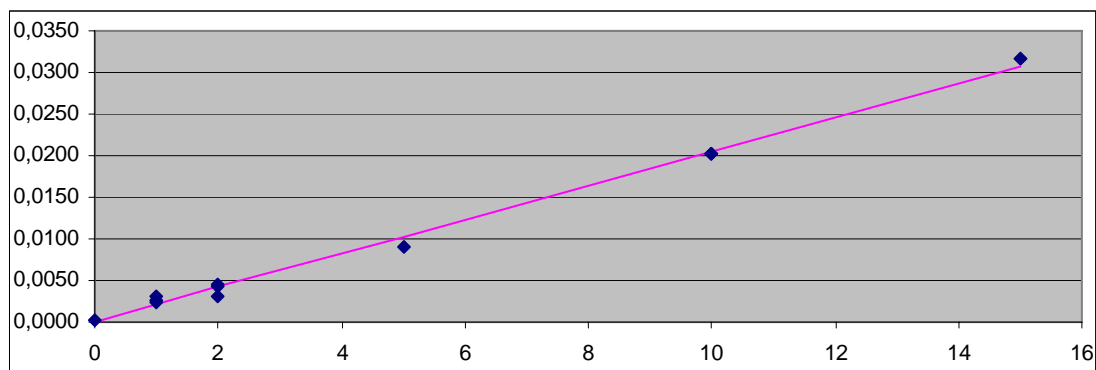




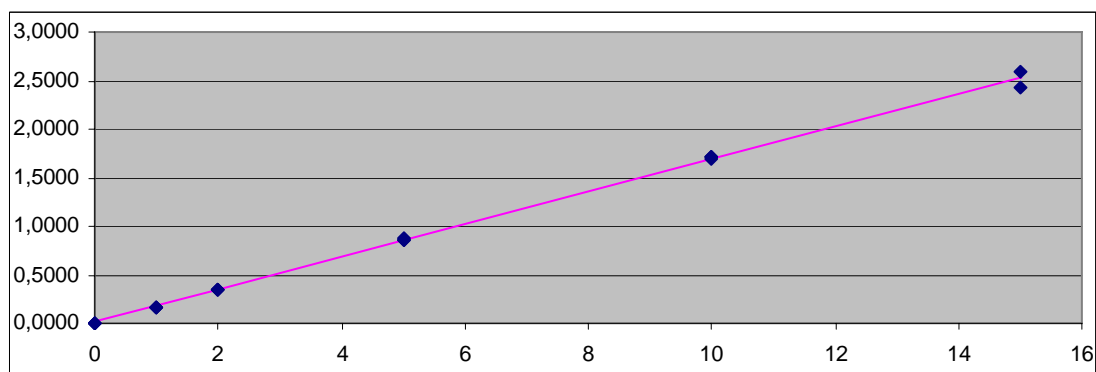


Anexo 3 – Curvas de Calibração Obtidas

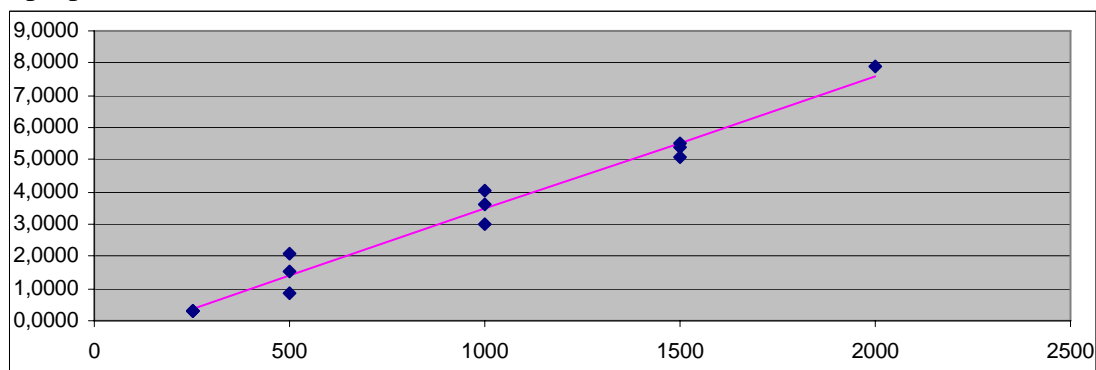
GBL



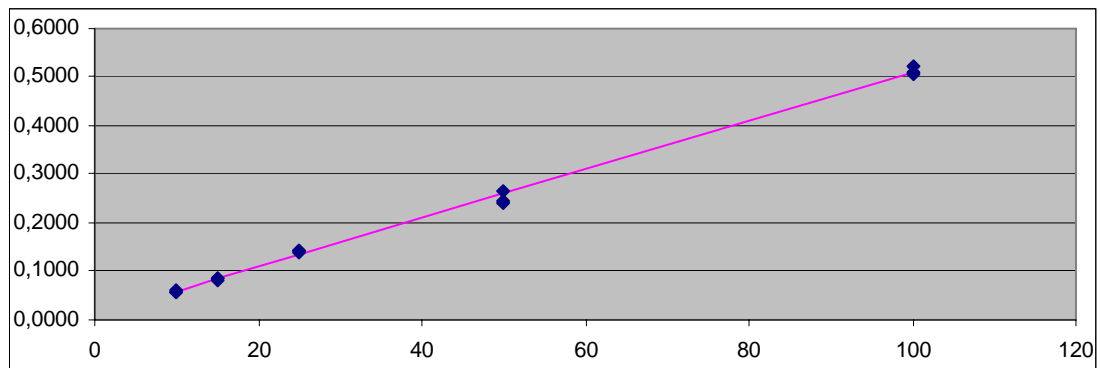
GHB



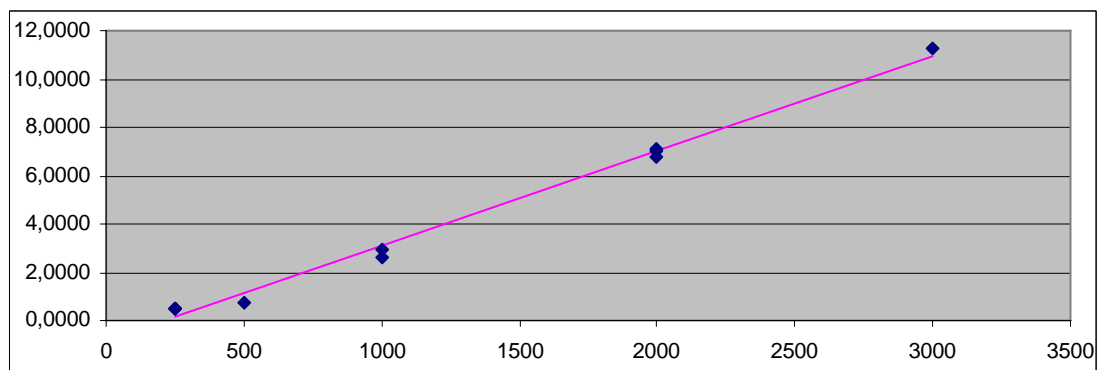
d-propoxifeno



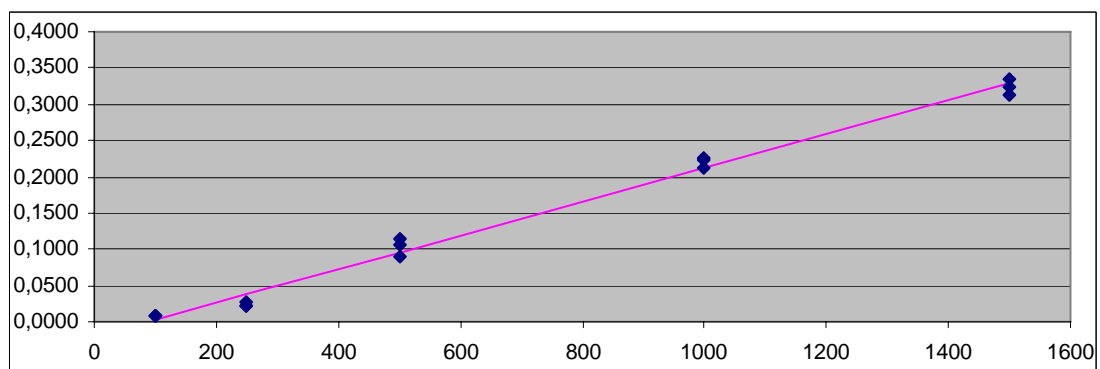
PCP



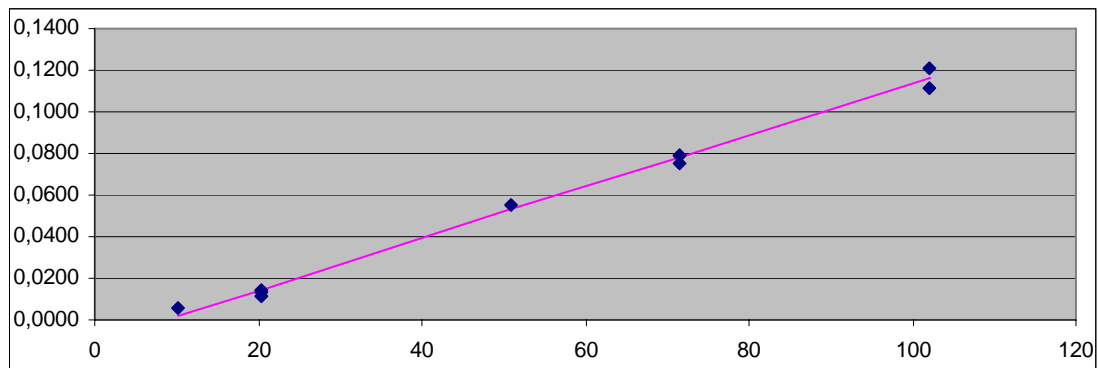
Cetamina



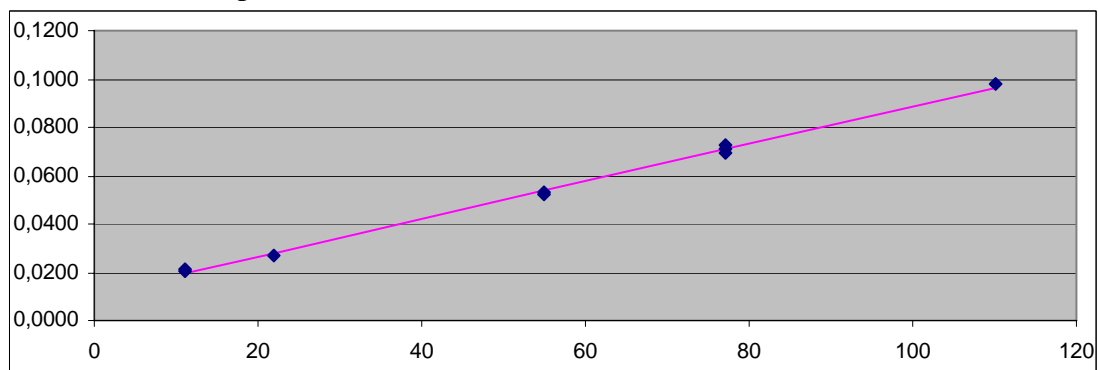
Metadona



Flunitrazepam



7-Aminoflunitrazepam



Buprenorfina

